



**VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ**

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**FAKULTA CHEMICKÁ**

FACULTY OF CHEMISTRY

**ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ**

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**STANOVENÍ AROMATICKY AKTIVNÍCH LÁTEK VE  
VYBRANÉM TYPU SÝRA**

ASSESSMENT OF AROMA ACTIVE COMPOUNDS IN SELECTED TYPE OF CHEESE

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

BACHELOR'S THESIS

**AUTOR PRÁCE**

AUTHOR

**Andrea Dostálková**

**VEDOUCÍ PRÁCE**

SUPERVISOR

**Ing. Eva Vítová, Ph.D.**

**BRNO 2017**

## Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1092/2016  
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií  
Studentka: **Andrea Dostálková**  
Studijní program: Chemie a technologie potravin  
Studijní obor: Biotechnologie  
Vedoucí práce: **Ing. Eva Vítová, Ph.D.**  
Akademický rok: 2016/17

### Název bakalářské práce:

Stanovení aromaticky aktivních látek ve vybraném typu sýra

### Zadání bakalářské práce:

1. Zpracujte literární přehled dané problematiky:
  - sýry s vysokodohřívanou sýřeninou – charakteristika, složení, vlastnosti, technologie výroby
  - aromaticky aktivní látky - charakteristika, rozdělení; aromatické látky v sýrech
  - plynová chromatografie s hmotnostní detekcí (GC-MS), princip, popis, instrumentace
2. Pomocí metody SPME-GC-MS identifikujte aromaticky aktivní látky ve vzorcích sýrů s vysokodohřívanou sýřeninou
3. Porovnejte aromatický profil jednotlivých vzorků

### Termín odevzdání bakalářské práce: 19.5.2017

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

-----  
Andrea Dostálková  
student(ka)

-----  
Ing. Eva Vítová, Ph.D.  
vedoucí práce

-----  
prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá stanovením aromaticky aktivních látek v sýrech ementálského typu a v sýrech typu Moravský bochník, tj. přírodní tvrdé sýry s vysokodohřívanou sýřeninou.

V teoretické části jsou tyto sýry charakterizovány, je popsáno jejich chemické složení a jednotlivé kroky technologie výroby. Dále je zpracována literární rešerše problematiky aromaticky aktivních látek a popsána metoda jejich stanovení pomocí mikroextrakce pevnou fází a plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií.

V experimentální části byla vybraná SPME-GC-MS metoda použita k identifikaci těkavých aromaticky aktivních látek v sýrech s vysokodohřívanou sýřeninou zakoupených v běžné tržní síti a v modelových vzorcích sýrů vyrobených na Univerzitě Tomáše Bati ve Zlíně za použití různých poměrů přidaných mlékařských kultur.

Mezi vzorky byly nalezeny rozdíly v počtu a druhu těkavých sloučenin. Celkem bylo ve vzorcích sýrů identifikováno 129 sloučenin, z toho 35 alkoholů, 9 aldehydů, 24 ketonů, 16 karboxylových kyselin, 23 esterů, 1 ether, 16 uhlovodíků, 2 sírné a 3 dusíkaté sloučeniny.

## ABSTRACT

This bachelor thesis deals with the aroma active compounds of Emmental and Moravský bochník types of cheeses, i.e. natural hard cheese with high heat curd.

In the theoretical part these cheeses are characterized, their chemical composition is described as well as individual steps of their manufacturing process. After that a literature search focused on aroma active substances is made and the following methods are described: solid phase microextraction for their isolation and gas chromatography with mass spectrometry for detection.

In the experimental part the selected SPME-GC-MS method is used to identify volatile aroma active compounds in cheeses with high heat curd bought on the market and samples of model cheeses manufactured at Tomas Bata University in Zlín with the use of various ratios of added dairy cultures.

The differences among samples were found in the number and types of volatile compounds. A total of 129 compounds were identified in samples; of those 35 alcohols, 9 aldehydes, 24 ketones, 16 carboxylic acids, 23 esters, 1 ether, 16 hydrocarbons, 2 sulphurous and 3 nitrogenous compounds.

## KLÍČOVÁ SLOVA

sýry, aromaticky aktivní látky, SPME, GC-MS

## KEY WORDS

cheese, aroma active compounds, SPME, GC-MS

DOSTÁLKOVÁ, A. *Stanovení aromaticky aktivních látek ve vybraném typu sýra*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 60 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Eva Vítová, Ph.D..

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....  
podpis studenta

### *Poděkování:*

*Ráda bych poděkovala Ing. Evě Vítové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, ochotu, laskavost a pomoc při zpracování této bakalářské práce a Univerzitě Tomáše Bati ve Zlíně za poskytnuté vzorky. Dále bych ráda poděkovala své rodině a přátelům za podporu při psaní této práce, kolegům v laboratoři za spolupráci a v neposlední řadě také všem hodnotitelům za ochotu a investování jejich volného času.*

## OBSAH

|   |          |
|---|----------|
| <b>1 ÚVOD.....</b>                                    | <b>7</b> |
| <b>2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY .....</b>      | <b>8</b> |
| 2.1 Složení mléka jako suroviny pro výrobu sýrů ..... | 8        |
| 2.1.1 Mléčné bílkoviny .....                          | 8        |
| 2.1.2 Mléčné lipidy .....                             | 9        |
| 2.1.3 Sacharidy mléka .....                           | 9        |
| 2.1.4 Minerální látky .....                           | 9        |
| 2.1.5 Vitaminy .....                                  | 9        |
| 2.2 Rozdělení sýrů .....                              | 9        |
| 2.3 Sýry s vysokodohřívanou sýřeninou.....            | 10       |
| 2.3.1 Sýry ementálského typu.....                     | 10       |
| 2.3.2 Sýry typu Moravský bochník .....                | 11       |
| 2.4 Technologie výroby sýrů .....                     | 11       |
| 2.4.1 Příprava mléka před sýřením .....               | 11       |
| 2.4.2 Sýření.....                                     | 12       |
| 2.4.3 Zpracování sýřeniny .....                       | 12       |
| 2.4.4 Formování a lisování .....                      | 13       |
| 2.4.5 Solení.....                                     | 13       |
| 2.4.6 Balení.....                                     | 13       |
| 2.4.7 Zrání.....                                      | 13       |
| 2.5 Aromaticky aktivní látky .....                    | 14       |
| 2.5.1 Uhlovodíky .....                                | 14       |
| 2.5.2 Alkoholy a fenoly .....                         | 14       |
| 2.5.3 Etery.....                                      | 15       |
| 2.5.4 Karbonylové sloučeniny .....                    | 15       |
| 2.5.5 Karboxylové kyseliny.....                       | 15       |
| 2.5.6 Estery .....                                    | 15       |
| 2.5.7 Aromatické látky v sýrech.....                  | 16       |
| 2.5.8 Vznik aromaticky aktivních látek v sýrech ..... | 16       |
| 2.5.8.1 Metabolismus laktosy, laktátu a citrátu ..... | 16       |
| 2.5.8.2 Proteolýza .....                              | 17       |
| 2.5.8.3 Katabolismus volných aminokyselin .....       | 18       |

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| 2.5.8.4  | Lipolýza a metabolismus volných mastných kyselin .....                               | 18        |
| 2.6      | Použité instrumentální techniky .....  | 20        |
| 2.6.1    | Mikroextrakce pevnou fází .....  | 20        |
| 2.6.2    | Plynová chromatografie .....   | 21        |
| 2.6.2.1  | Instrumentace plynové chromatografie .....   | 21        |
| 2.6.3    | Hmotnostní spektrometrie .....   | 22        |
| 2.6.3.1  | Instrumentace hmotnostní spektrometrie .....   | 23        |
| 2.6.4    | Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí .....                                    | 24        |
| <b>3</b> | <b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>   | <b>26</b> |
| 3.1      | Laboratorní vybavení .....   | 26        |
| 3.1.1    | Přístroje .....  | 26        |
| 3.1.2    | Plyny .....  | 26        |
| 3.1.3    | Pracovní pomůcky .....   | 26        |
| 3.2      | Čisté mlékařské kultury .....  | 26        |
| 3.3      | Analyzované vzorky .....   | 27        |
| 3.4      | Metoda SPME-GC-MS .....  | 29        |
| 3.4.1    | Příprava vzorku sýra pro stanovení aromaticky aktivních látek .....                  | 30        |
| 3.4.2    | SPME-GC-MS analýza .....   | 31        |
| 3.4.2.1  | Podmínky SPME extrakce .....   | 31        |
| 3.4.2.2  | Podmínky GC-MS analýzy .....   | 31        |
| 3.4.3    | Vyhodnocení výsledků analýzy .....   | 32        |
| <b>4</b> | <b>VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>  | <b>33</b> |
| 4.1      | Výsledky stanovení aromaticky aktivních látek pomocí metody SPME-GC-MS ...           | 33        |
| 4.1.1    | Identifikace těkavých látek ve vzorcích sýrů .....                                   | 33        |
| 4.1.2    | Trvanlivost a uchovávání vzorků .....  | 34        |
| 4.1.3    | Srovnání identifikovaných sloučenin ve vzorcích komerčních sýrů .....                | 35        |
| 4.1.4    | Srovnání identifikovaných sloučenin ve vzorcích modelových sýrů .....                | 36        |
| 4.1.5    | Srovnání identifikovaných sloučenin ve vzorcích modelových vs. komerčních sýrů ..... | 37        |
| <b>5</b> | <b>ZÁVĚR .....</b>   | <b>47</b> |
| <b>6</b> | <b>SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ .....</b>   | <b>48</b> |
| <b>7</b> | <b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....</b>  | <b>52</b> |
| <b>8</b> | <b>PŘÍLOHY .....</b>   | <b>53</b> |

# 1 ÚVOD

Sýry jsou již od pradávna neodmyslitelnou součástí naší výživy. Z nutričního hlediska patří k nejhodnotnějším, navíc velice chutným potravinám.

Jsou bohaté na živočišné bílkoviny, včetně všech esenciálních aminokyselin, dále slouží jako zásobárna energie ve formě mléčného tuku, v němž jsou rozpuštěné důležité vitamíny A, D, E a K, a jsou také cenným zdrojem dobře vstřebatelného vápníku a dalších minerálních látek.

V dnešní době se po celém světě vyrábí obrovské množství sýrů různých druhů, které se od sebe liší svojí konzistencí, chutí i aroma. Tato práce je věnována problematice přírodních sýrů s vysokodohřívanou sýřeninou, především typu Moravský bochník, který se začal vyrábět během druhé světové války na našem území, a pro jehož výrobu se stal vzorem Ementál.

Přítomnost těkavých senzoricky aktivních sloučenin, tzv. aromaticky aktivních, vznikajících především při procesu zrání sýrů, určuje jejich výslednou charakteristickou chuť a aroma.

Cílem této bakalářské práce je pomocí metody SPME-GC-MS identifikovat aromaticky aktivní látky v modelových vzorcích sýrů typu Moravský bochník vyrobených na Univerzitě Tomáše Bati ve Zlíně a obdobných vzorcích sýrů běžně dostupných v tržní síti.

## 2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Sýr je podle vyhlášky č. 397/2016 Sb. definován jako „*mléčný výrobek vyrobený vysrážením mléčné bílkoviny z mléka působením syřidla nebo jiných vhodných koagulačních činidel, prokysáním a oddělením podílu syrovátky*“ [1].

Z nutričního hlediska jsou sýry plnohodnotnými potravinami obsahujícími všechny esenciální aminokyseliny, mléčné bílkoviny a tuk jsou využitelným zdrojem energie. Sýry jsou mimo jiné bohaté také na minerální látky (především vápník a fosfor) a vitaminy [2, 3].

Výroba sýrů je považována za jednu z nejnáročnějších mlékárenských technologií, při níž dochází k fyzikálně-chemickým změnám všech složek mléka [3].

### 2.1 Složení mléka jako suroviny pro výrobu sýrů

Na výrobu sýrů se nejčastěji jako základní surovina používá kravské mléko. Mléko je polydisperzní systém, který obsahuje cca 87,3 % vody tvořící disperzní prostředí, zbylých 12,7 % tvoří sušina. Ta se skládá z mléčných bílkovin (3,4 %), mléčného cukru (okolo 4,7 %) a mléčného tuku (3,7 % a více). V menším množství se v mléce vyskytují také vitaminy rozpustné ve vodě i v tucích, minerální látky a celá řada dalších látek. Složení sušiny se během roku mění v důsledku kolísání množství tuku a bílkovin v mléce, na což má vliv řada faktorů, především krmení zvířat [2, 4].

Při výrobě sýra dochází ke změnám obsahu látek v mléce. V důsledku snížení obsahu vody dojde u většiny složek k zakoncentrování, avšak obsah některých látek výrazně klesne; buď jejich odstraněním společně se syrovátkou, nebo jejich metabolickou přeměnou [3, 5, 6].

#### 2.1.1 Mléčné bílkoviny

Bílkoviny obsažené v mléce můžeme zařadit jak do skupiny jednoduchých bílkovin, jako albuminy a globuliny (syrovátkové bílkoviny), tak mezi bílkoviny složité (kasein). Celkový obsah bílkovin v kravském mléce je 3,4 %, z čehož 2,8 % připadá na kasein a zbytek tvoří bílkoviny syrovátky. Poměr kaseinových a syrovátkových bílkovin je přibližně 4 : 1 [6–8].

Kaseinové bílkoviny jsou fosfoproteiny, které jsou v mléce přítomny ve formě kaseinových micel. Jejich obtížná rozpustnost ve vodě je způsobena vysokým podílem nepolárních aminokyselin v primární struktuře, i když rozpustnosti mírně napomáhá obsah fosfoserinových jednotek a v případě  $\kappa$ -kaseinu i obsah sacharidických složek. Hodnota izoelektrického bodu kaseinu je pH 4,6, při kterém dochází k agregaci micel, čehož se využívá při kyselém srážení mléka a tedy při výrobě některých druhů sýrů. K základním frakcím kaseinového komplexu patří  $\alpha_{s1}$ -kasein tvořící společně s  $\beta$ -kaseinem největší podíl kaseinových bílkovin. Dalšími frakcemi jsou  $\alpha_{s2}$ -kasein a  $\kappa$ -kasein. Liší se od sebe především počtem fosfátových zbytků, hydrofobicitou a citlivostí k vápenatým iontům [2, 6–8].

Syrovátkové (sérové) bílkoviny se v sýru vyskytují jen v minimálním množství, protože se při pH 4,6 nesrážejí, zůstávají v koloidním roztoku a následně po vysrážení kaseinu jsou společně se syrovátkou odděleny od syřeniny. Jedná se především o globuliny a albuminy. Na rozdíl od kaseinu neobsahují atomy fosforu. Přibližně 50 % syrovátkových bílkovin tvoří  $\beta$ -laktoglobulin a asi 30 %  $\alpha$ -laktalbumin, které velmi snadno denaturují. V menším množství



se vyskytují i sérový albumin, laktoferin, imunoglobuliny, proteoz-peptony a transferin [2, 6–8].

Bílkoviny nejsou jedinými dusíkatými látkami obsaženými v mléce. V malém množství se v něm vyskytují i např. močovina, amoniak, kreatin, kyselina močová, lipoproteiny, enzymy aj [2].

### **2.1.2 Mléčné lipidy**

Přibližně 98 % lipidů obsažených v kravském mléce tvoří triacylglyceroly. V minoritním podílu se vyskytují také di- a monoacylglyceroly, volné mastné kyseliny, cholesterol, popř. jeho deriváty a fosfolipidy (lecithin, kefalin, sfingomyelin). Složení tuku výrazně závisí na podmínkách krmení, proto během roku podléhá silným výkyvům. Triacylglyceroly jsou v mléce uspořádány ve formě tukových kapének obalených membránou. Funkcí této protein-fosfolipidové trojvrstvy je stabilizace (emulgace) kapének ve vodném prostředí mléka, a ochrana před působením lipolytických enzymů a oxidací mastných kyselin, což by mohlo způsobit nežádoucí pachy a příchutě [2, 6].

### **2.1.3 Sacharidy mléka**

V kravském mléce se nachází přibližně 4,7 % sacharidů, z nichž typický je redukující disacharid složený z D-galaktopyranosy a D-glukopyranosy, spojených  $\beta$ -1,4-glykosidickou vazbou, tzv. laktosa. Vyskytuje se v obou anomerních formách ( $\alpha$ -laktosa a  $\beta$ -laktosa), které díky mutarotaci mohou mezi sebou přecházet. Laktosa je v průběhu metabolických procesů přeměněna na kyselinu mléčnou, propionovou a další senzory aktivní látky, takže její obsah v sýrech je prakticky nulový. Dalšími sacharidy vyskytujícími se v mléce, avšak v menším množství, jsou D-glukosa, D-fruktosa, D-galaktosa, N-acetylglukosamin, N-acetylgalaktosamin aj [2, 6].

### **2.1.4 Minerální látky**

Celkový obsah minerálních látek je obvykle stanoven ve formě tzv. popelovin, který u kravského mléka činí přibližně 0,7 %. Kompletní směs solí je z výživově-fyziologického hlediska velmi důležitá pro zásobování lidského organismu. Minerální látky se v mléce nacházejí zejména jako sodné, vápenaté, hořečnaté a draselné soli fosforečnanů, chloridů, síranů, citratanů, uhličitanů a hydrogenuhličitanů. Při výrobě sýra je kladen důraz hlavně na obsah vápníku v mléce kvůli správnému průběhu sladkého srážení kaseinových micel [2, 6].

### **2.1.5 Vitaminy**

Obsah vitaminů v mléce je, stejně jako u všech výše zmíněných látek, závislý na složení krmné směsi. Vitaminy se podílejí při metabolických drahách jako koenzymy, prekurzory hormonů nebo jako antioxidanty. Mléko obsahuje vitaminy rozpustné v tucích (A, D, E, K) a také vitaminy rozpustné ve vodě (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, kyselina listová, kyselina pantotenová, C, H). K nažloutlé barvě mléka přispívají především karotenoidy [2, 6].

## **2.2 Rozdělení sýrů**

V dnešní době existuje široký sortiment nabízených sýrů, které lze rozdělit do kategorií podle různých kritérií [9].

Podle obsahu vody v tukuprosté hmotě rozeznáváme sýry [2, 9]:

- extra tvrdé (méně než 51,0 hm. %)
- tvrdé (49,0–56,0 hm. %)
- polotvrdé (54,0–69,0 hm. %)
- měkké (minimálně 67,0 hm. %)

Dále můžeme sýr charakterizovat obsahem tuku v sušině [2, 9]:

- vysokotučný (nejméně 60 hm. %)
- plnotučný (45–60 hm. %)
- polotučný (25–45 hm. %)
- nízkotučný (10–25 hm. %)
- odtučněný (méně než 10 hm. %)

Sýry můžeme také dělit podle způsobu zrání. Mezi nezrající (čerstvé) sýry patří např. tvarohové nebo smetanové sýry, termizované či pařené sýry. Plísňové sýry mohou být s plísní uvnitř těsta, s plísní na povrchu a/nebo existují speciality s plísní na povrchu i uvnitř těsta. Sýry zrající lze rozdělit na sýry zrající převážně od povrchu do vnitřní hmoty sýra, tzv. sýry s mazem, a na sýry s anaerobním zráním v celé hmotě [2, 9].

Do této široké skupiny anaerobně zrajících sýrů můžeme zařadit [2, 9]:

- sýry zrající v chladu
- sýry s nízkodohřívanou sýřeninou (sýry eidamského typu, sýry čedarového typu, sýry z pařeného těsta, sýry s tvorbou ok)
- sýry s vysokodohřívanou sýřeninou (sýry ementálského typu, sýry typu Moravský bochník, sýry na strouhání)

## **2.3 Sýry s vysokodohřívanou sýřeninou**

Vzhledem k zaměření této práce bude dále věnována pozornost především sýrům s vysokodohřívanou sýřeninou. Podle výše uvedeného rozdělení patří tyto sýry mezi tvrdé plnotučné anaerobně zrající. Do této skupiny sýrů patří sýry ementálského typu a sýry typu Moravský bochník, popř. sýry na strouhání (Parmazán, Grana, Sbrinz, Gran Moravia). Společným znakem těchto sýrů je pozvolné dohřívání sýřeniny na vyšší teplotu (48–55 °C) za stálého míchání, čímž se ze zrna vyloučí více syrovátky, s následným procesem dosoušení, tzn. výdrž při této teplotě, kterým se dosáhne požadované hodnoty sušiny v sýru [3, 9, 10].

### **2.3.1 Sýry ementálského typu**

Kolébkou sýrů ementálského typu je švýcarské údolí řeky Emme poblíž Bernu. Originální švýcarský Ementál se vyrábí ze syrového mléka ve tvaru bochníku s mírně vyklenutými plochami o váze 40–70 kg. Má suchou kůru a pevné vláčné těsto s charakteristickými rovnoměrně rozloženými oky o průměru 0,5–1,5 cm. Chuť a vůně sýra je jemná a mandlově nasládlá. Obsah látek v Ementálu (45 % tvs.) na 100 g je: bílkoviny (27,8 g), tuk (29,3 g), sušina (63,6 g), voda (36,4 g), tuk v sušině (46,1 g), vápník (1 180 mg), fosfor (860 mg), chlorid sodný (0,8 g) [2, 3, 9].

Vedle mezofilní kultury se při výrobě sýrů ementálského typu používají také termofilní kultury (*Streptococcus salivarius* subsp. *termophilus*, *Lactobacillus delbruecki* subsp. *lactis*,

*Lactobacillus helveticus*, popř. *Lactobacillus casei*) a propionová kultura zajišťující vznik pravidelných ok v těstě sýra pomocí CO<sub>2</sub> vznikajícího při fermentaci mléčnanu. Zrání tedy probíhá v chladném i kvasném sklepe [2, 3, 9].

### **2.3.2 Sýry typu Moravský bochník**

Moravský bochník je sýr ementálského typu českého původu. Jeho výroba byla zavedena již v průběhu první světové války na Moravě. Hlavní důvod jeho zavedení byl ten, že mlékárny zaměstnávaly především ženy, pro které byla práce s velkými ementálskými bochníky obtížná. Proto se přestoupilo k výrobě menších bochníků o váze okolo 15 kg s menšími oky než u Ementálu [3, 9, 11].

V současné době se vyrábí především ve tvaru hranolu někdy označovaného jako tzv. Moravský blok. Má pružné těsto s malým množstvím malých ok, popř. nemá žádné oka, a jeho chuť je mírně nasládlá a málo výrazná. Technologie výroby Moravského bochníku je podobná výrobě Ementálu. Sýrové zrno se však dohřívá a dosouší při nižší teplotě (48–50 °C) a i doba zpracování je kratší. Sýr je téměř bez ok, protože zrání Moravského bochníku probíhá pouze v chladném sklepe [3, 9, 11].

## **2.4 Technologie výroby sýrů**

### **2.4.1 Příprava mléka před sýřením**

Na mléko, jakožto základní surovinu pro výrobu sýru, se kladou vysoké požadavky na jakost. Mléko musí pocházet od zdravých, dobře živěných dojníc, nesmí obsahovat rezidua inhibičních látek a vysoký počet mikroorganismů. Důležitou roli hraje také chemické složení mléka, a to především obsah a rovnováha kaseinu a minerálních látek, jako jsou vápník, hořčík a fosfor, což ovlivňuje sýřitelnost mléka [3, 10].

Mechanické nečistoty jsou z mléka odstraněny filtrací nebo centrifugací. Pro zdravotní nezávadnost je dále mléko tepelně ošetřeno tzv. pasterací, aby došlo k odstranění přítomné termolabilní mikroflóry, především patogenní. Při výrobě sýrů se používá šetrná pasterace, aby nedocházelo k denaturaci bílkovin a tvorbě komplexu s kaseinem, takže κ-kasein je přístupný pro působení syřidla [3, 5, 8, 9].

Každý sýr má charakteristickou hodnotu tuku v sušině, proto je nutné provést standardizaci mléka, protože obsah tuku a bílkovin v mléce není po celý rok stálý [8, 9].

Do mléka se přidávají i některá aditiva. Přídavek chloridu vápenatého (max. 200 g/1 000 l mléka) způsobuje zlepšení sýřitelnosti zhoršené po pasteraci a zvyšuje pevnost sýřeniny a tím i její kvalitu. Tzv. duření, především u sýrů s nižší kyselostí, mohou způsobit koliformní bakterie a bakterie máselného kvašení. Aby se tomu zabránilo, přidává se do mléka dusičnan draselný (průměrně 100 g/1 000 l mléka). V dnešní době je ale snaha o omezení jeho užívání, protože vyšší dávky KNO<sub>3</sub> mohou brzdit činnost kyselinotvorných kultur nebo reakce tyrosinu s dusitanem může způsobit vznik barevných vad sýrů. Místo přídavku KNO<sub>3</sub> je možné redukovat spory baktérií. Druhou možností je zaočkování pasterovaného mléka pomocí ochranné dávky smetanové kultury a ponechání do druhého dne, tzv. předezrání, čímž se upraví mikroflóra mléka ovlivňující průběh sýření a zrání sýrů. Některé sýry se i dobarvují, k tomuto účelu se používá např. annatto nebo karoten [3, 9].

Takto připravené mléko je napuštěno do sýrařského výrobníku, kde se jeho teplota upraví na teplotu sýření (30–33 °C) a přidají se čisté mlékařské kultury a syřidlo. Do prakticky všech sýrů se přidává mezofilní (smetanová) kultura. Podle druhu vyráběného sýru je možné přidat i další kultury. Jak již bylo zmíněno, při výrobě sýrů s vysokohřívanou sýřeninou s tvorbou ok v těstě (ementálský, Moravský bochník) se do mléka přidávají také termofilní bakterie a propionové bakterie, které jsou podmínkou pro správnou tvorbu ok [3, 9, 10].

#### 2.4.2 Sýření

Sýření neboli srážení kaseinu je fyzikálně-chemický proces, který představuje základní technologický krok při výrobě sýrů. Kasein se z mléka může koagulovat při srážení kyselém, při kterém se sníží hodnota pH na hodnotu blízkou jeho izoelektrickému bodu (pH = 4,6). Dalším typem koagulace, které se používá pro většinu typů sýrů, je srážení (sladké) působením syřidla. V primární fázi tohoto sýření dochází k enzymatickému štěpení specifické peptidové vazby v kaseinové frakci rozpustného  $\kappa$ -kaseinu mezi 105. a 106. aminokyselinou (Phe – Met) za vzniku nerozpustného para- $\kappa$ -kaseinu a současného odštěpení  $\kappa$ -kaseinmakropeptidu. Tento glykopeptid je složený z 64 zbytků aminokyselin a obsahuje hydrofilní část molekuly  $\kappa$ -kaseinu s vázanými oligosacharidy, takže přechází do syrovátky. V sekundární (koagulační) fázi se již tvoří gel za přítomnosti vápenatých iontů. Následuje tzv. synereze, při které za současného uvolňování syrovátky dochází ke smršťování gelu. Při terciární fázi dochází k proteolytickému působení syřidla v průběhu zrání. Celková doba sýření se obvykle pohybuje kolem 30 minut. Na kvalitu sýřeniny má vliv teplota, koncentrace syřidlového enzymu a kyselost mléka [3, 5, 9, 10, 12].

Aktivní složkou klasického syřidla, které se získává extrakcí telecích žaludků, je enzym chymosin (rennin). V důsledku omezených zdrojů jsou místo něj používány další enzymové preparáty živočišného, rostlinného nebo mikrobiálního původu [9, 12].

#### 2.4.3 Zpracování sýřeniny

Zpracování sýřeniny představuje výrobní krok, při kterém dochází k vytvoření sýrových zrn vhodných pro formování sýra a oddělení potřebného množství syrovátky. Obecně můžeme říct, že čím větší množství syrovátky se odstraní z tuhé gelovité hmoty, tím tvrdší sýr získáme. Na druhou stranu obsah syrovátky jakožto živného substrátu pro mikroorganismy je důležitý pro zrání sýra [3, 9, 10].

Prvním krokem zpracování sýřeniny je její krájení. Provádí se pomocí soustavy plochých nebo strunných nožů uložených v rámu, tzv. sýrařských harf, otáčejících se v různých výškových rovinách po dobu asi 20 minut. Vzniklé sýrové zrno o velikostech 3–15 mm se následně opatrně míchá, aby nedošlo k roztříštění částic na tzv. sýrařský prach, který by byl odváděn společně se syrovátkou, čímž by se snížila výtěžnost. Negativní důsledek má i sedimentace a slepování zrn. Obsah sušiny sýru je ovlivněn dobou míchání [3, 9].

U sýrů ementálského typu dochází ještě navíc k dohřívání a dosoušení sýřeniny za stálého míchání zrna. Při dohřívání dochází ke zvyšování teploty z teploty sýření na teplotu dosoušení. U sýrů s vysokodohřívanou sýřeninou se pro dosoušení používají teploty mezi 48–56 °C, čímž je podpořeno další uvolnění syrovátky. Obecně platí, že čím vyšší teplotu použijeme, tím se vyloučí větší množství syrovátky ze zrna [3, 9, 10].

#### 2.4.4 Formování a lisování

Nejprve je potřeba oddělit syrovátku od syrového zrna. U tvrdých a polotvrdých sýrů se lisování, při kterém dochází k uvolnění syrovátky, provádí v obdélníkových lisovacích vanách se vzduchovými pryžovými polštáři a lisovacími deskami. Podle požadovaného tvaru sýra jsou v lisovací vaně umístěna tvořítka. Dochází k postupnému narůstání tlaku (5–400 kPa), tak aby nedošlo ke zpevnění struktury na povrchu sýra a zamezení tak odtoku syrovátky. Tyto procesy dávají sýrům finální tvar, velikost a předběžně i texturu. Syrovátka je většinou odváděna do sběrné nádrže k dalšímu zpracování, např. zahuštění a sušení [3, 9].

#### 2.4.5 Solení

Při solení sýrů dochází ke zpevnění jejich povrchu, úpravě chuti, regulaci obsahu vody, ovlivnění aktivity kultur a enzymů při zrání. Sůl proniká do sýra difuzí. Solení většiny sýrů probíhá v solné lázni. Koncentrace NaCl v lázni bývá nejčastěji 18–22 %. Pro tvrdé sýry je požadované pH solné lázně 5,2 a teplota 10–12 °C. Doba solení závisí na tvaru a velikosti sýra. Požadovaný výsledný obsah soli v sýru typu Moravský bochník je 1,3 % [3, 9, 10].

Koncentrace NaCl v solné lázni postupně klesá, proto je potřeba sůl postupně doplňovat. Také je nezbytné upravovat její kyselost, přefiltrovat pro odstranění bílkovinné sraženiny a sterilizovat povařením kvůli mikrobiální nečistotě [10].

Po vytažení sýrů ze solné lázně se nasolené sýry ponechají oschnout po dobu 1–2 dnů a poté se buď zabalené, nebo nebalené dávají zrát do zracích sklepů [3, 9].

#### 2.4.6 Balení

Přímý obal je krycí materiál, který pokrývá celý povrch jednoho sýra anebo jednoho jeho výřezu, jehož použitím je sýr chráněn před vnějšími vlivy. Při zabalení sýrů tedy nedochází k jejich povrchové kontaminaci a ztráty vysycháním při zrání jsou minimální. Jako balící materiál se nejčastěji používají zrací fólie nebo plastové nátěry. Propustnost fólie pro CO<sub>2</sub> ovlivňuje jakost sýrů. Při fermentaci zbytků laktosy dochází k hromadění CO<sub>2</sub> v hmotě sýra, čímž mohou vznikat vady v sýrech. Pro sýry ementálského typu se používají vícevrstvé fólie typu PE-PAD-EVA [3, 10].

Pod pojmem přepravní balení se rozumí balení jednoho nebo více kusů sýrů v přímém balení do přepravních obalů. Moravský bochník a Ementálský sýr se balí do přepravních obalů v jednom kuse [10].

#### 2.4.7 Zrání

Zráním je označován souhrn změn sýra způsobených činnostmi kultur a syřidlových enzymů, při kterých sýr získává výsledný vzhled, vůni, chuť, konzistenci a složení [3, 9].

Již při zpracování mléka a syřeniny, formování a solení dochází k předběžnému zrání, při kterém probíhá fermentace laktosy. Je nutné dosáhnout požadované kyselosti, u tvrdých sýrů pH = 5,2 [3, 9].

U tvrdých a polotvrdých sýrů je charakteristickým znakem zrání rozklad bílkovin, na kterém se podílejí mikrobiální proteolytické enzymy, syřidlo a nativní proteasa mléka plazmin. Nejprve je parakasein štěpen syřidlem, u vysokodohříváných sýrů plazminem, což urychluje působení mikrobiálních enzymů štěpících polypeptidy na polypeptidy s nižší molekulovou hmotností, dipeptidy a aminokyseliny [9].

Tvrdé sýry zrají současně v celé hmotě, jedná se o tzv. anaerobní zrání. Po určitém čase se enzymové a mikrobiologické změny zastaví, zatímco vypařování vody pokračuje. Tvrdé sýry mají proto vysokou trvanlivost [10].

Hlavní zrání probíhá ve zrácích sklepích. Využívají se dva druhy sklepů. U chladných sklepů s relativní vlhkostí 80–100 % se teplota pohybuje od 10 do 15 °C a zrání probíhá asi 1 měsíc. Teplé kvasné sklepy mají teplotu 20–26 °C a relativní vlhkost vzduchu 90 %. V kvasných sklepích se rozvíjí činnost propionové kultury a dochází k tzv. otevírání sýrů. Dozrávání probíhá opět v chladném sklepě. Délka zrání sýrů s vysokodohřívanou sýřeninou se pohybuje kolem 3 měsíců a déle. Sýry jsou uloženy na policích a musejí se obracet, aby nedošlo k deformaci a zrání i vysychání sýrů probíhalo rovnoměrně. Tvrdé sýry ementálského typu se musejí také pravidelně omývat, aby nedošlo k narušení povrchu růstem nežádoucích plísní [3, 9].

## **2.5 Aromaticky aktivní látky**

Podstatou experimentální části této práce je stanovení aromaticky aktivních látek v sýrech s vysokodohřívanou sýřeninou. Aromaticky aktivní látky jsou těkavé sloučeniny, které dávají potravinám jejich charakteristickou vůni a chuť. Jedná se tedy o látky senzoricky aktivní, vnímáme je především svými čichovými a chuťovými receptory. Tyto vonné a chuťové látky řadíme do různých chemických skupin, jako jsou např. aldehydy a ketony, karboxylové kyseliny a jejich deriváty atd. Jen výjimečně se u potravin setkáme s tím, že by jejich výslednou chuť, barvu a vůni určovala přítomnost jen jediné substance či několika málo látek, většinou se jedná o složitou směs více sloučenin [12].

### **2.5.1 Uhlovodíky**

Uhlovodíky se běžně vyskytují v mnoha potravinách. Mohou být buď primárními látkami, tedy přirozenou složkou potravinářských materiálů a surovin, anebo vznikají enzymovými a chemickými reakcemi jako sekundární látky při skladování a zpracování potravin, zejména při oxidaci lipidů. Mnohem více než pro aromatizaci potravin se uhlovodíky využívají k syntéze jiných vonných látek. V průmyslu vonných a chuťových látek a v tukovém průmyslu našly některé uhlovodíky (hexan) nebo jejich směsi (petrolether) použití jako rozpouštědla. Uhlovodíky v potravinách lze podle struktury rozdělit na alifatické, alicyklické a aromatické. Terpenové uhlovodíky mají největší význam jako přírodní barviva, vonné a chuťové látky [12].

### **2.5.2 Alkoholy a fenoly**

Za první stupeň oxidační řady uhlovodíků lze považovat alkoholy a fenoly. Tyto látky se vyskytují jak v potravinách rostlinného, tak živočišného původu jako primární i sekundární vonné a chuťové látky. Přírodními vonnými látkami jsou hlavně nižší alifatické nasycené a nenasycené alkoholy. Významnými chuťovými látkami jsou např. glycerol, cukerné alkoholy a hydroxykyseliny. Pro aromatizaci potravin se používají alkoholy s nejvýše 15–18 atomy uhlíku v molekule. Nižší alkoholy slouží při výrobě příslušných esterů, acetalů a dalších sloučenin, které jsou uplatňovány při aromatizaci potravin nebo jako potravinářská barviva [12].

Alkoholy jsou v důsledku přítomnosti vodíkových můstků dobře rozpustné ve vodě a mají relativně vysoký bod varu. Mezi významné reakce alkoholů patří jejich oxidace na karbonylové sloučeniny a esterifikace. Většina těchto reakcí je enzymově katalyzována [12].

Ethanol vázaný v esterech je v malém množství běžnou složkou aroma mnoha potravin. Volný ethanol vzniká při tzv. alkoholovém kvašení jako hlavní produkt anaerobního odbourávání sacharidů kvasinkami [12].

### 2.5.3 Ethers

Aromatické ethers a ethers odvozené od mono- a seskviterpenů jsou často vonnými a chuťovými látkami v potravinách. Primární složkou aroma potravin bývají epoxidy terpenů (oxirany, furany, pyrany). Mohou vznikat také jako sekundární produkty oxidace a dehydratace celé řady sloučenin, např. karotenoidních pigmentů, sterolů, mastných kyselin a mnoha dalších [12].

### 2.5.4 Karbonylové sloučeniny

Těkavé aldehydy a ketony patří k nejdůležitějším vonným a chuťovým látkám. V potravinách se vyskytují buď jako primární nebo sekundární látky enzymových a chemických reakcí. Mohou být jak žádoucí, tak i nežádoucí nositelé vůně a chutě potravin, takže často slouží jako indikátory nežádoucích senzorických změn či změn výživové hodnoty potravin [12].

Téměř všechny nasycené alifatické aldehydy mají význam jako aromaticky aktivní látky. Prekurzory pro celou řadu senzoricky významných karbonylových sloučenin jsou nenasycené mastné kyseliny v lipidech, některé těkavé aldehydy a ketony vznikají degradací sacharidů, z aminokyselin vznikají aldehydy především jako sekundární produkty alkoholového a mléčného kvašení [12].

Řada významných ketonů vzniká degradací karotenoidů anebo mají původ v degradaci cukrů. Nejrozšířenějším ketonem je aceton, který vzniká dekarboxylací acetoctové kyseliny tvořící se při  $\beta$ -oxidací mastných kyselin jako meziprodukt [12].

Mezi karbonylové sloučeniny patří také řada polárních netěkavých sloučenin, mezi nimi např. redukující cukry a produkty jejich transformace, které jsou většinou nositeli sladké chuti [12].

### 2.5.5 Karboxylové kyseliny

Významnou složkou převážně potravin rostlinného původu jsou karboxylové kyseliny. Vyskytují se především jako alifatické, alicyklické, aromatické i heterocyklické s jednou nebo více karboxylovými funkčními skupinami. Mezi vonné a chuťové látky patří hlavně nižší a některé aromatické kyseliny. Významné alifatické kyseliny, patřící mezi nositele kyselé chuti potravin, jsou kyselina octová a mléčná. Řada kyselin je ve formě triacylglycerolů složkou tuků nebo jsou prekurzory dalších vonných a chuťových látek (estery, laktony aj.) [12].

### 2.5.6 Estery

Estery patří k nejrozšířenějším sloučeninám v potravinách. Jedná se o produkty reakcí kyselin s alkoholy. Významnými vonnými látkami jsou obvykle estery nižších alifatických

kyselin s nižšími alifatickými nebo aromatickými alkoholy. Některé estery mohou vznikat v malém množství i při záhřevu nebo dlouhodobém skladování [12].

Významným typem esterů, vyskytujícím se v potravinách jako vonné látky, jsou laktony. Jedná se o cyklické sloučeniny vznikající intramolekulární esterifikací hydroxykarboxylových kyselin. Podle počtu atomů uhlíků mezi uhlíkem s navázanou hydroxylovou skupinou a karboxylovou funkční skupinou jsou děleny na  $\beta$ -laktony,  $\gamma$ -laktony a  $\delta$ -laktony.  $\gamma$ -Laktony a  $\delta$ -laktony vznikající dehydratací příslušných hydroxykyselin se často vyskytují jako vonné látky v potravinách. Laktony přispívají máslovému charakteru sýru [5, 13, 14].

### 2.5.7 Aromatické látky v sýrech

Sýry obsahují velké množství aromatických látek, které se značně liší jak v kvalitativním, tak v kvantitativním zastoupení podle typu sýru. Chuť sýra je výsledkem rovnováhy komplexní směsi těkavých chuťových látek [5, 13].

Analytickými chemickými rozbory a smyslovým hodnocením byly identifikovány aromatické těkavé látky důležité pro výslednou chuť a aroma sýrů a dalších mléčných výrobků. Mezi tyto sloučeniny patří především mastné kyseliny, estery, aldehydy a ketony, alkoholy a sloučeniny síry [15].

V tvrdých sýrech se vyskytují především některé estery (např. ethyl-butanoát) a různé alifatické karboxylové kyseliny (např. kyselina máselná). U sýrů vyrobených pomocí bakterií propionového kvašení (Ementál) jsou důležitými aromatickými látkami kyselina propionová, methyl-thioacetát, laktony ( $\delta$ -dekalakton), aminy aj [12].

### 2.5.8 Vznik aromaticky aktivních látek v sýrech

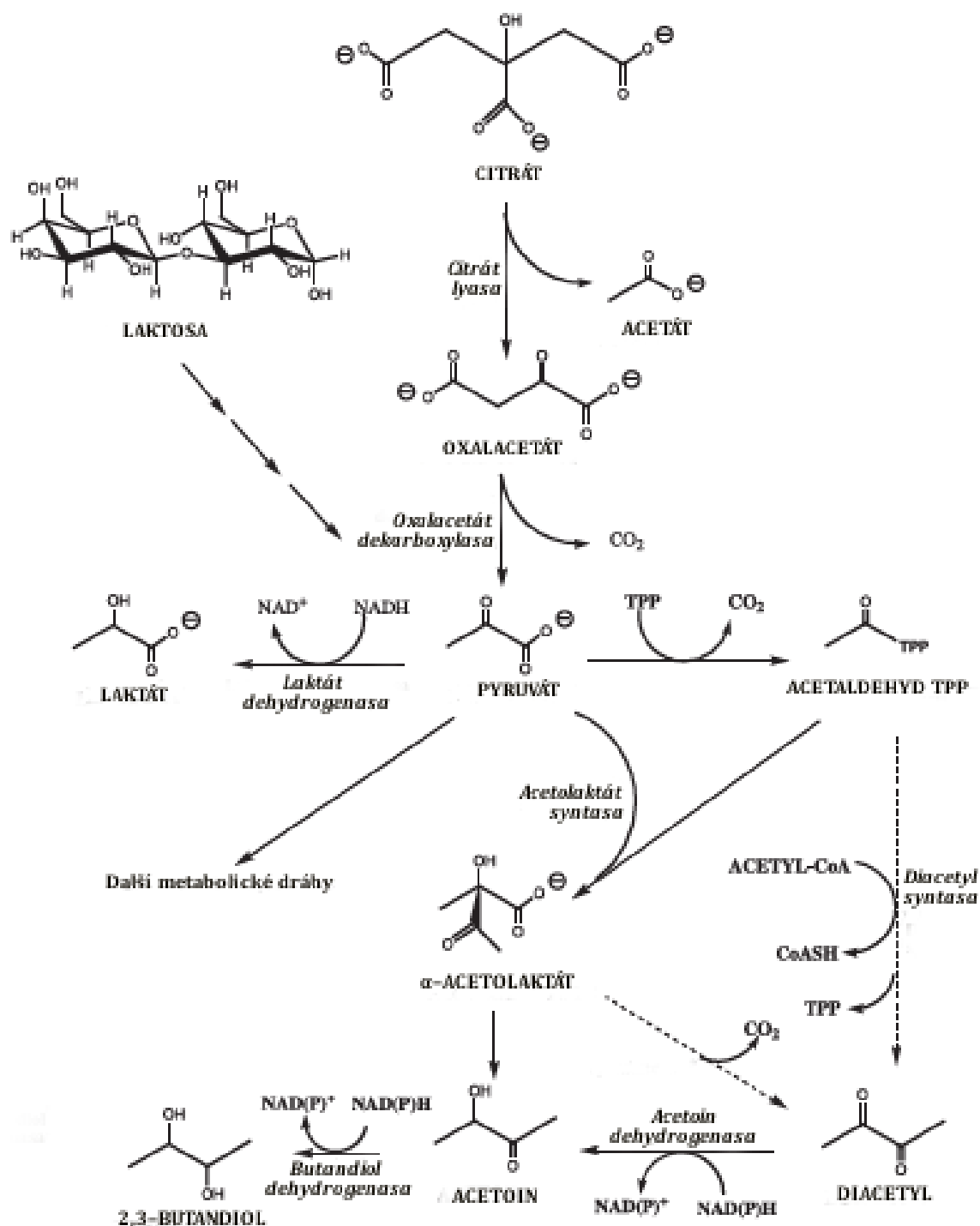
Většina aromatických látek v sýrech vzniká během procesu zrání a je odvozena od tří základních metabolických procesů: proteolýzy, lipolýzy a metabolismu laktosy.

#### 2.5.8.1 Metabolismus laktosy, laktátu a citrátu

K metabolismu laktosy dochází především v prvních dnech zrání sýra. Velmi malé množství laktosy, které nebylo odstraněno společně se syrovátkou, je odbouráváno v rámci glykolýzy prostřednictvím bakterií rodu *Lactococcus* na pyruvát. Ten je prekurzorem pro celou řadu aromaticky aktivních látek s krátkým řetězcem, mezi které patří biacetyl, acetaldehyd, acetoin, ethanol a další. Nebo může být pyruvát dále přeměněn pomocí enzymu NAD-laktátdehydrogenasy na laktát (L-, D- nebo jejich směs). Metabolismus laktátu má zásadní význam pro vývoj chuti a struktury Ementálu a jeho příbuzných druhů. Laktát je odbouráván pomocí bakterií rodu *Propionibacterium* na propionát, acetát a CO<sub>2</sub>. Propionát a acetát přispívají k chuti sýra, zatímco CO<sub>2</sub> se akumuluje v sýřenině, čímž vznikají charakteristická sýrová oka [5, 16].

Velký význam má také metabolická dráha citrátu. Nejenže během ní vzniká velké množství CO<sub>2</sub>, který, jak už bylo uvedeno, je zodpovědný za tvorbu ok charakteristických pro některé sýry, ale také dochází k produkci látek přispívajících k chuti těchto sýrů. Mezi hlavní senzoricky aktivní sloučeniny vzniklé během metabolismu citrátu patří acetát, biacetyl, acetoin a butan-2,3-diol. Tyto látky mohou být také prekurzory pro vznik dalších sloučenin [5, 16]. Obrázek 1 zobrazuje přehledné schéma metabolismu laktosy, laktátu a citrátu.





Obrázek 1: Schéma metabolismu laktózy, laktátu a citrátu v sýrech [upraveno podle: 16]

### 2.5.8.2 Proteolýza

Během zrání sýrů je proteolýza nejdůležitějším metabolickým procesem při tvorbě vůně, chuti a struktury sýru. Při tomto procesu dochází k degradaci para- $\kappa$ -kaseinu, který je téměř bez chuti, na polypeptidy, které jsou dále štěpeny pomocí enzymů peptidas a proteas na oligosacharidy a volné aminokyseliny se specifickými chutěmi. Vzniklé aminokyseliny mohou následně podléhat sekundárním katabolickým změnám, mezi které patří deaminace,



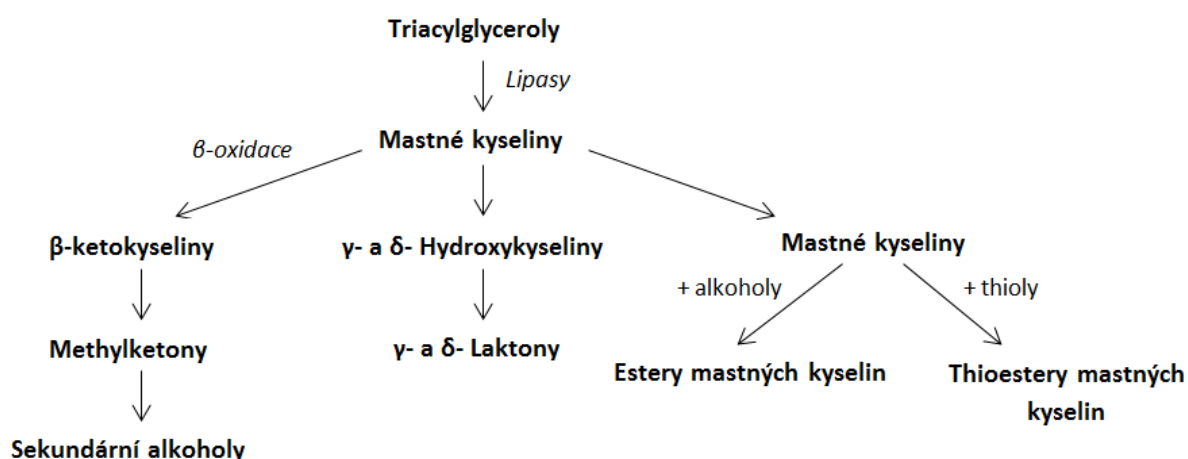
Mléčný tuk je důležitý pro správný rozvoj charakteristické chuti sýra v průběhu zrání. Může podléhat hydrolytickým a oxidačním degradacím. Oxidace lipidů se u sýrů nevyskytuje ve významném rozsahu, pravděpodobně v důsledku nízkého redoxního potenciálu a přítomnosti přírodních antioxidantů (např. vitamin E) [14].

Velmi důležitým biochemickým dějem při zrání sýra je lipolýza. Jedná se o enzymově katalyzovanou hydrolýzu esterových vazeb triacylglycerolů za vzniku glycerolu, mastných kyselin a mono- nebo diacylglycerolů. Rozsáhlá lipolýza však může být u některých typů sýra považována za nežádoucí, protože vysoký obsah volných mastných kyselin může u těchto sýrů vést ke žluknutí [5].

Některé uvolněné mastné kyseliny, zejména ty s kratším nebo středně dlouhým řetězcem, přímo přispívají k chuti a aroma sýrů, zvláště pokud jsou ve správné rovnováze s produkty proteolýzy a dalších reakcí. Jiné jsou prekurzory pro vznik dalších aromaticky aktivních látek [5, 14].

Během katabolismu volných mastných kyselin vznikají především estery a thioestery, aldehydy, sekundární alkoholy, laktony a u některých sýrů methylketony. Estery vznikají jako hlavní produkty reakcí volných mastných kyselin s alkoholy, pocházejícími především z katabolismu aminokyselin a fermentace laktosy. Při reakcích kyselin s thioley, jakožto katabolity aminokyselin obsahujících atomy síry, vznikají thioestery [5, 14].

U některých sýrů (např. sýry s modrou plísní v těstě, Ementál) bylo prokázáno, že se v průběhu zrání zvyšuje koncentrace methylketonů. Ty jsou v sýru tvořeny jako důsledek působení lipas plísní, především rodu *Penicillium*. Nejprve dochází k uvolnění mastných kyselin pomocí lipas, následuje oxidace uvolněných kyselin na  $\alpha$ -ketokyseliny a katabolismus pokračuje dekarboxylací ketokyselin na methylketony. Posledním krokem, který je však za aerobních podmínek vratný, je redukce methylketonů na odpovídající sekundární alkoholy [5, 14]. Obrázek 3 zobrazuje podrobné schéma lipolýzy v sýrech.



Obrázek 3: Schéma lipolýzy a metabolismu volných mastných kyselin v sýrech [upraveno podle: 16, 19]

## 2.6 Použité instrumentální techniky

Pro stanovení aromaticky aktivních látek ve vzorcích sýrů s vysokodohřívanou sýřeninou byla zvolena metoda mikroextrakce pevnou fází s následnou analýzou pomocí plynové chromatografie s detekcí hmotnostním spektrometrem.

### 2.6.1 Mikroextrakce pevnou fází

Počátky této techniky se datují do 90. let 20. století. Mikroextrakce pevnou fází (SPME) je jednoduchá, rychlá a velmi účinná metoda vhodná i pro nízké koncentrace sledovaných látek. Využívá se ve spojení s kapalinovou a plynovou chromatografií. Principem je sorpce analytu z matrice vzorku na vlákno (Obrázek 4), dokud nedojde k dosažení rovnováhy. Křemenné vlákno je pokryto různými typy stacionární fáze lišící se svou polaritou i sorpčními vlastnostmi. Podle uspořádání lze rozlišit 3 základní typy extrakcí: přímá, headspace a membránová extrakce [20–23].

Analyt je ze stacionární fáze následně desorbován, v případě plynové chromatografie vysokou teplotou přímo v injektoru [20–23].

Využití SPME poskytuje značné výhody. Vzorky se před analýzou nemusejí upravovat, není vyžadováno použití rozpouštědla, dochází k zakoncentrování sloučenin při odběru vzorku a poskytuje lineární odezvu v širokém koncentračním rozsahu. I pro nízké koncentrace analytů lze volbou vhodného typu vlákna dosáhnout reprodukovatelných výsledků. Technika má také velmi nízké nároky na objem vzorků [20, 22–24].



Obrázek 4: SPME vlákno

#### ***Přímá extrakce***

Během přímé extrakce je vlákno ponořeno do vzorku, přičemž dochází k přenosu analytu z matrice na stacionární fázi vlákna [23].

#### ***Headspace extrakce***

Tato metoda spočívá v průchodu analytu bariérou plynné fáze nad vzorkem (headspace). Těkavé látky jsou extrahovány rychleji než látky méně těkavé, protože se v headspace fázi vyskytují ve vyšších koncentracích [23].

Výhoda této metody spočívá především v ochraně vlákna před poškozením látkami s vysokou molekulovou hmotností a jinými netěkavými látkami přítomnými v matrici nebo při úpravě některých vlastností vzorku (např. pH) [23].

#### ***Membránová extrakce***

Podobně jako tomu je v případě headspace extrakce, tak i při nepřímé extrakci přes membránovou bariéru je snaha ochránit vlákno před poškozením. Použití membrány je také vhodné pro stanovení analytů s malou těkavostí pro headspace extrakci. Proces je ovšem

podstatně pomalejší než u přímé extrakce, protože analyty musí nejprve difundovat přes membránu a teprve následně dojde k navázání na stacionární fázi [23].

## **2.6.2 Plynová chromatografie**

Plynová chromatografie (GC) je analytická a separační metoda, při které dochází k dělení složek směsi ve vzorku, pomocí dvou heterogenních fází: stacionární (nepohyblivé) a mobilní (pohyblivé) [25].

Mobilní fáze GC se nazývá nosný plyn. Jeho funkcí je inertní transport složek analyzovaného plynného vzorku, protože se separovanými sloučeninami a stacionární fází neinteraguje [25, 26].

S rostoucí teplotou v koloně se sloučeniny separují na základě rozdílné interakce se stacionární fází. Podle druhu stacionární fáze rozeznáváme adsorpční a rozdělovací GC. Principem plynové adsorpční chromatografie je adsorpce plynné složky na povrchu tuhého adsorbentu. U plynové rozdělovací chromatografie je jako stacionární fáze použita tenká vrstva netěkavé kapaliny na povrchu tuhého nosiče s nízkou adsorpční schopností [25].

Separované složky postupují kolonou k detektoru, kterým jsou následně analyzovány [26].

### **2.6.2.1 Instrumentace plynové chromatografie**

Hlavními částmi GC jsou: zdroj nosného plynu, čistící zařízení, regulátor průtoku, dávkovač, kolona, termostat, detektor a řídicí a vyhodnocovací zařízení pro zpracování signálu z detektoru [27].

#### ***Zdroj nosného plynu, čistící zařízení, regulační systém***

Zdrojem mobilní fáze bývají tlakové lahve permanentních plynů, jako jsou dusík, vodík, argon nebo helium, s regulátory tlaku a průtoku. Volbu nosného plynu ovlivňuje především druh kolony a detektoru. Je kladen důraz na vysokou čistotu mobilní fáze, proto jsou součástí chromatografu i čistící zařízení absorbující vlhkost, nečistoty a nežádoucí stopy ostatních plynů. Nosný plyn proudí kolonou v důsledku tlakového spádu. Na počátku kolony je tlak vyšší, objem plynu je tedy menší a plyn proudí nižší lineární rychlostí než na konci kolony, kde je tlak atmosférický. Funkcí regulačního systému je zajištění konstantního nebo programovatelného průtoku [25, 26, 28].

#### ***Dávkovací zařízení***

Dávkovač neboli injektor slouží k převedení analytu do plynného stavu a nástřiku vzorku na počátek kolony do proudu mobilní fáze. Teplota dávkovače by měla být alespoň o 50 °C vyšší než teplota varu nejméně těkavé složky, aby nedošlo ke kondenzaci vzorku [25–27].

Mezi nejpoužívanější typy dávkování patří [25–27]:

- Dávkovač přímo do kolony (On column injector)
- Dávkovač bez děliče toku (Splitless injector)
- Dávkovač s děličem toku (Split injector)
- Dávkovač s programově zvyšovanou teplotou vypařování vzorku

## ***Chromatografické kolony***

Nejdůležitější částí plynového chromatografu je separační kolona se stacionární fází. Kolony, které se využívají pro GC, jsou náplňové a kapilární. Náplňové kolony jsou většinou ocelové nebo skleněné trubice naplněné sorbenty nebo nosiči, na kterých je nanesena stacionární fáze. Mají větší kapacitu, ale horší rozlišovací schopnost než kolony kapilární. Uložení stacionární fáze u kapilárních kolon může být různé, podle toho rozlišujeme 3 typy separačních kolon [25–28]:

- WCOT (Wall Coated Open Tubular) – stacionární fáze je nanesena na vnitřní straně kolony ve formě tenkého filmu
- PLOT (Porous Layer Open Tubular) – na vnitřní straně kapiláry je vytvořena pórovitá vrstva, která je smáčena stacionární fází
- SCOT (Support Coated Open Tubular) – kapalná stacionární fáze je navázána na povrchu pevného nosiče

Výběr kolony závisí především na vlastnostech separovaných složek vzorku [26].

## ***Termostat***

Termostat udržuje konstantní teplotu dávkovače, kolony a detektoru (každý má svůj vlastní termostat). Druhou možností je vytvoření teplotního programu pro gradientovou eluci, čímž lze ovlivnit hodnoty retenčních časů, takže separace látek, jejichž teploty varu se výrazně liší, není tak časově náročná jako při izotermické eluci [25, 26].

## ***Detektory***

Úkolem detektoru je rozpoznat přítomnost analytu v nosném plynu. Detektor sleduje určitou vlastnost eluovaného plynu, která závisí na druhu a koncentraci složek. Mezi požadavky na detektor patří univerzálnost, nízké detekční limity, vysoká citlivost, reprodukovatelnost signálu, stabilita, lineární a rychlá odezva a vysoká selektivita. Signál detektoru je zaznamenáván v závislosti na čase, výsledný grafický záznam se nazývá chromatogram. Používá se celá řada detektorů, které se liší jednak principem funkce, ale i vlastnostmi [25–27]:

- Plamenový ionizační detektor
- Tepelně vodivostní detektor
- Plamenový fotometrický detektor
- Plamenový termoionizační detektor
- Detektor elektronového zachytu
- Olfaktometrický detektor
- Atomový emisní detektor
- Hmotnostní spektrometr

### **2.6.3 Hmotnostní spektrometrie**

Hmotnostní spektrometrie (MS) je velmi účinná separační a identifikační analytická technika, při které dochází k ionizaci. Vzniklé ionty z atomů, molekul a molekulových

fragmentů se následně separují podle podílu jejich hmotnosti a náboje (mass-to-charge  $m/z$ ) [29, 30].

Používá se ke kvalitativní i kvantitativní chemické analýze. Lze ji využít i jako detektor například při plynové chromatografii, kapalně chromatografii a kapilární elektroforéze [29, 30].

#### **2.6.3.1 Instrumentace hmotnostní spektrometrie**

Hlavní části hmotnostního spektrometru jsou: vstup do hmotnostního spektrometru, iontový zdroj, analyzátor, detektor, řídicí a vyhodnocovací zařízení a vakuový systém [26, 30].

##### ***Iontový zdroj***

Ionizace molekul vzorku je způsobena nevratným odštěpením valenčních elektronů. Podle množství dodané energie rozdělujeme ionizační techniky na tvrdé a měkké.

Ionizační techniky lze také dělit podle fázového stavu analyzovaného vzorku [28, 30, 31]:

Ionizace plynné fáze:

- Elektronová ionizace
- Chemická ionizace
- Ionizace indukčně vázaným plazmatem

Ionizace kapalně fáze:

- Elektrosprej
- Chemická ionizace za atmosférického tlaku
- Fotoionizace za atmosférického tlaku

Ionizace pevného skupenství:

- Ionizace laserem za přítomnosti matrice

##### ***Elektronová ionizace***

Elektronová ionizace (EI) patří do skupiny tvrdých ionizačních technik. Molekuly v plynné fázi jsou ionizovány svazkem elektronů, které jsou emitovány ze žhaveného wolframového nebo rheniového vlákna a následně urychleny elektrostatickým polem (energie elektronů 70 eV). Nejenom že při interakci elektronu s neutrální molekulou dojde k její ionizaci, ale molekula také získá velký přebytek vnitřní energie, který způsobí i její fragmentaci. Protože tato technika je reprodukovatelná, dají se touto metodou vytvářet knihovny hmotnostních spekter vhodné pro identifikaci daných látek [25, 29].

Výhodou této ionizační metody, která se používá zvláště ve spojení s plynovou chromatografií, je vysoká citlivost, bohatá spektra na fragmentované ionty, reprodukovatelnost a použití pro celou řadu látek [25, 29].

##### ***Hmotnostní analyzátor***

Hmotnostní analyzátoři dělí vzniklé ionty podle poměru  $m/z$ . Mezi nejpoužívanější analyzátoře patří kvadrupólový analyzátor, iontová past a průletový analyzátor [28].

### *Kvadrupólový analyzátor*

Kvadrupólový analyzátor je tvořen dvěma páry rovnoběžných tyčových elektrod kruhového průřezu. Ty jsou připojeny ke zdroji stejnosměrného napětí a současně ke zdroji vysokofrekvenčního střídavého napětí. Ionť je z iontového zdroje přiveden do středu osy kvadrupólu, kde začne oscilovat. O trajektorii dráhy iontu rozhodují velikosti stejnosměrného napětí, amplitudy a frekvence radiofrekvenčního pole. Podle zvolených hodnot projdou po stabilní trajektorii k detektoru jen ionty o určité hodnotě podílu  $m/z$ . Ostatní ionty na nestabilních drahách jsou zachyceny na tyčích kvadrupólu. Nastavení těchto veličin se mění, takže na detektor postupně dopadají ionty o různých hodnotách  $m/z$  [26, 29].

Kvadrupól je jednoduchý, malý a relativně levný analyzátor, jehož nevýhody jsou ale nízké rozlišení a menší rozsah měřitelných hmotností v porovnání s jinými analyzátory [26, 29].

### **Detektory**

Podle způsobu detekce můžeme detektory v MS rozdělit do dvou kategorií [26, 30, 31]:

- Detektory pro přímá měření – detekce elektrického proudu vznikajícího při dopadu analyzovaných iontů.
- Násobičové detektory – princip spočívá v násobení uvolněných elektronů při dopadu iontů. Detektor se vyznačuje vysokou citlivostí.

### **Vakuový systém**

Střední volná dráha iontů by měla být delší než fyzická vzdálenost iontového zdroje detektoru, proto během analýzy nesmí docházet ke srážkám iontů s jinými částicemi. Z tohoto důvodu je v systému udržován velmi nízký tlak. Používají se buď rotační olejové vývěvy, pro tlaky nižší difuzní vývěva nebo turbomolekulární čerpadlo [25, 30].

#### **2.6.4 Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí**

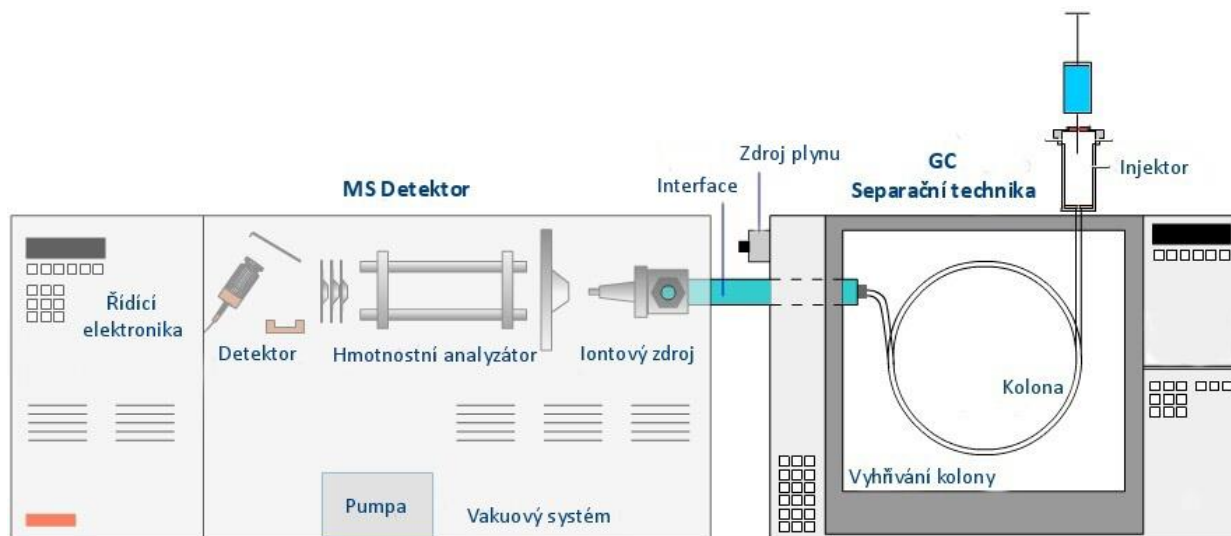
První využití hmotnostního spektrometru jako detektoru plynové chromatografie (schéma viz Obrázek 5) se datuje již do 50. let 20. století. Přímá kombinace vysoké separační schopnosti kapilární plynové chromatografie s vysoce specifickou detekcí hmotnostním spektrometrem (GC-MS) je v současné době jedním z nejúčinnějších nástrojů pro identifikaci a kvantifikaci složek složitých vzorků organických látek po jejich předchozí chromatografické separaci. Během jedné analýzy je směs látek zároveň separována i identifikována. To nám umožňuje efektivně získat informace o spektru separovaných látek. Výsledkem analýzy pomocí GC-MS jsou chromatogram a hmotnostní spektrum každé složky vzniklé separací v GC [29–32].

Problémem propojení těchto metod je tlaková nekompatibilita přístrojů. Aby nedošlo k porušení vakua v MS a tím k jeho poškození, je nutné odčerpávat přebytečné množství mobilní fáze. Tento problém bývá zpravidla vyřešen použitím děliče spojujícího GC a MS, který dělí proud nosného plynu s eluovanými složkami vstupující do běžného detektoru GC a do iontového zdroje hmotnostního spektrometru. Ionizační techniky, které se nejčastěji používají pro GC-MS, jsou elektronová nebo chemická ionizace [28, 31, 32].

Výhodou detekce pomocí MS je univerzálnost, specifčnost, selektivita, nízké detekční limity, lineární dynamický rozsah a reprodukovatelné výsledky. Mezi nevýhody patří vysoká



cena detektoru, vyšší nároky na údržbu, obtížné čištění přístroje, některé analýzy složitých směsí látek touto metodou mohou být časově náročné [27, 32, 33].



Obrázek 5: Schéma plynového chromatografu s hmotnostním detektorem [34]

### 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 3.1 Laboratorní vybavení

##### 3.1.1 Přístroje

- Plynový chromatograf Trace<sup>TM</sup> 1310 se split/splitless injektorem (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- Hmotnostní detektor ISQ<sup>TM</sup> LT Single Quadrupole (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- Knihovna spekter NIST/EPA/NIH, Verze 2.0 (Gaithersburg, Maryland, USA)
- Analytické digitální váhy HELAGO, GR–202–EC, Itálie
- Počítač PC, Intel Pentium Procesor
- Lednice s mrazákem

##### 3.1.2 Plyny

- Helium, čistota 4.8., v tlakové lahvi s redukčním ventilem (SIAD, Česká republika)

##### 3.1.3 Pracovní pomůcky

- SPME vlákno, Supelco, Bellefonte, Pennsylvania, USA
  - DVB/CAR/PDMS 50/30 µm
- Vialky o objemu 10 ml se šroubovacím magnetickým uzávěrem
- Běžné laboratorní sklo a pomůcky
- Nůž, struhadlo

#### 3.2 Čisté mlékařské kultury

Pro výrobu modelových sýrů byly použity tři komerčně dostupné lyofilizované kultury vhodné k přímému zaočkování do mléka (Chr. Hansen, Dánsko).

Termofilní kultura LH B02

Složení: *Lactobacillus helveticus*

Termofilní kultura STI-12

Složení: *Streptococcus thermophilus*

Mezofilní aromatická kultura, typ LD

Složení: *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*

*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*

*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

*Leuconostoc* spp.

### 3.3 Analyzované vzorky

V experimentální části byly analyzovány dva náhodně vybrané vzorky sýrů s vysokodohřívanou syřeninou zakoupené v běžné tržní síti a modelové vzorky přírodních sýrů typu Moravský bochník (45 % tuk v sušině, 60 % sušiny), které byly vyrobeny standardním technologickým postupem během června–září 2016 na Univerzitě Tomáše Bati ve Zlíně.

Vzorky z běžné tržní sítě byly po zakoupení převezeny do laboratoře a podrobeny analýze, u sýru Madeta Moravský bochník byl navíc odebrán vzorek, který byl okamžitě po převozu do laboratoře zmražen (na teplotu  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) a analyzován až po 1 měsíci. Modelové vzorky byly ihned po odběru zmraženy a uchovány tak až do doby analýzy (bližší informace o komerčních vzorcích sýrů viz Tabulka 1 a Tabulka 2).

Tabulka 1: Údaje na obalu vzorku Madeta Moravský bochník

| Madeta Moravský bochník |                                       |
|-------------------------|---------------------------------------|
| Popis                   | Přírodní tvrdý sýr, plátky            |
| Tuk v sušině [%]        | 45                                    |
| Sušina [%]              | 60                                    |
| Složení                 | Mléko, jedlá sůl, mlékárenské kultury |
| Hmotnost [g]            | 100                                   |
| Výrobce                 | MADETA a.s. (Česká republika)         |



Obrázek 6: Přední strana balení vzorku Madeta Moravský bochník

Tabulka 2: Údaje na obalu vzorku *Président Emmental*

| <b>Président Emmental</b> |   |
|---------------------------|---|
| <b>Popis</b>              | Plátkový tvrdý sýr  |
| <b>Tuk v sušině [%]</b>   | 45  |
| <b>Sušina [%]</b>         | 60  |
| <b>Složení</b>            | Pasterované mléko, jedlá sůl, mlékárenské kultury, barvivo: betakaroten |
| <b>Hmotnost [g]</b>       | 100   |
| <b>Prodávající</b>        | Lactalis CZ, s.r.o.   |



Obrázek 7: Přední strana balení vzorku *Président Emmental*

Pro výrobu modelových vzorků bylo použito 35 litrů nestandardizovaného mléka. Mléko bylo pasterováno na teplotu min. 72 °C s výdrží 30 sekund, napuštěno do výrobku, vytemperováno na 32 °C a inokulováno lyofilizovanými čistými mlékařskými kulturami Flora Danica, LH B02 a STI-12 (Chr. Hansen, Dánsko) v požadovaném poměru (viz Tabulka 3). Po 15 minutách byl za stálého míchání přidán  $\text{CaCl}_2$  (36% w/w roztok; 50 ml na 100 litrů mléka) a zředěné syřidlo (950 IMCU/ml, CHY-MAX M, Chr. Hansen, Dánsko; 3,2 ml na 100 litrů mléka) a mléko bylo ponecháno v klidu pro srážení po dobu 30 minut. Vzniklá sýřenina se prokrojí syrářskou harfou na hranoly velikosti cca 2 × 2 cm a ponechá 10 minut v klidu, následně se drobí (cca 10 minut) do podoby rovnoměrně velkého zrna a zrno se vytužuje mícháním dalších 10 minut. Pomocí pláště výrobku se za stálého míchání zvýší teplota zrna na 47 °C a zrno se při této teplotě 60 minut dosouší.

Hotové zrno se vypustí do předlisovací vany vyložené plachetkou a předlisuje se vlastní hmotností nebo pomocí mírného tlaku po dobu 15 minut. Předlisovaná sýřenina se rozkrojí, vloží do lisovacích forem a lisuje se po dobu 2,5 hodin; po 90 minutách lisování se sýr otočí.

Bloky sýra o hmotnosti 1,5 kg se solí v solné lázni (konc. 20% w/w; teplota 8 °C) po dobu 14 hodin; poté se ponechají oschnout, zabalí se do smrštitelné polopropustné folie a uloží do zrací komory při teplotě 8–14 °C. Vzorky pro tuto práci byly odebrány po 4 měsících zrání (přehled všech analyzovaných vzorků viz Tabulka 4).

*Tabulka 3: Přehled modelových vzorků (kombinace kultur)*

| Vzorek                            | V1          | V2          | V3          | V4           |
|-----------------------------------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| <b>Poměr kultur A : B : C [%]</b> | 15 : 8 : 77 | 19 : 9 : 72 | 15 : 9 : 76 | 50 : 25 : 25 |

*A - kultura LH B02 , B - kultura STI-12, C - mezofilní kultura (viz kap. 3.2)*

*Tabulka 4: Seznam všech analyzovaných vzorků*

| Vzorek  | Číslo měření | Označení vzorku a měření |
|---|--------------|--------------------------|
| V1  | 1            | V1m <sub>1</sub>         |
| V1  | 2            | V1m <sub>2</sub>         |
| V2  | 1            | V2m <sub>1</sub>         |
| V2  | 2            | V2m <sub>2</sub>         |
| V3  | 1            | V3m <sub>1</sub>         |
| V3  | 2            | V3m <sub>2</sub>         |
| V4  | 1            | V4m <sub>1</sub>         |
| V4  | 2            | V4m <sub>2</sub>         |
| Madeta Moravský bochník                           | 1            | MBm <sub>1</sub>         |
| Madeta Moravský bochník                           | 2            | MBm <sub>2</sub>         |
| Président Emmental                                | 1            | Em <sub>1</sub>          |
| Président Emmental                                | 2            | Em <sub>2</sub>          |
| Madeta Moravský bochník<br>(po 1 měsíci zmražení) | 1            | MBZm <sub>1</sub>        |
| Madeta Moravský bochník<br>(po 1 měsíci zmražení) | 2            | MBZm <sub>2</sub>        |

### 3.4 Metoda SPME-GC-MS

Pro identifikaci těkavých látek ve vzorcích sýrů byla použita mikroextrakce pevnou fází ve spojení s plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí (SPME-GC-MS).



Obrázek 8: Plynový chromatograf Trace<sup>TM</sup> 1310 s hmotnostním spektrometrem ISQ<sup>TM</sup> LT

### 3.4.1 Příprava vzorku sýra pro stanovení aromaticky aktivních látek

Zmražený vzorek sýra byl před analýzou ponechán v lednici do druhého dne při teplotě do 6 °C a následně nastrován na jemném struhadle. Komerční sýry byly nakrájeny na malé kostičky. Po promíchání byly naváženy na analytických vahách 2 g sýra a přeneseny do vialky tak, aby při analýze nedošlo ke kontaktu s SPME vláknem (Obrázek 9). Poté byla vialka uzavřena šroubovacím magnetickým uzávěrem, aby nedocházelo k úniku těkavých látek.



Obrázek 9: Vialky s navážkou vzorku sýra před (nalevo) a po (napravo) analýze



### 3.4.2 SPME-GC-MS analýza

Vialka s naváženým vzorkem byla umístěna do agitátoru vytemperovaného na 40 °C na dobu 10 minut, aby byla dosažena rovnováha mezi vzorkem a headspace prostorem. Následně bylo do headspace prostoru vsunuto SPME vlákno a extrakce probíhala po dobu 20 minut. Po skončení extrakce bylo vlákno zasunuto zpět do ocelového obalu a přeneseno do horkého injektoru plynového chromatografu, kde došlo k desorpci (Obrázek 10).



Obrázek 10: Umístění vialky do agitátoru (vlevo) a SPME vlákno vsunuté do horkého injektoru GC – desorpce (vpravo)

#### 3.4.2.1 Podmínky SPME extrakce

- Doba inkubace (temperování): 10 min
- Doba extrakce: 20 min
- Teplota agitátoru (teplota extrakce a inkubace): 40 °C
- Agitátor zapnutý: 5 s
- Agitátor vypnutý: 60 s
- Množství vzorku: 2 g
- Hloubka ponoření vlákna do vialky: 20 mm

#### 3.4.2.2 Podmínky GC–MS analýzy

- Kapilární kolona TG–WaxMS (30 m × 0,25 mm × 0,5 µm)
- Teplota injektoru (teplota desorpce): 240 °C
- Doba desorpce: 20 min
- Dávkování: splitless, ventil uzavřen 10 min
- Hloubka ponoření vlákna do injektoru: 40 mm
- Nosný plyn: Helium

- Průtok nosného plynu:  $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$
- Teplotní program:  $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$  s výdrží 2 min, vzestupný gradient  $3 \text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  do  $110 \text{ }^{\circ}\text{C}$  s výdrží 10 min, vzestupný gradient  $3 \text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  do  $200 \text{ }^{\circ}\text{C}$  s výdrží 0 min, celková doba analýzy 65 min
- Hmotnostní detektor v modu EI
  - Energie ionizačních elektronů: 70 eV
  - Teplota iontového zdroje:  $200 \text{ }^{\circ}\text{C}$
  - Skenovací rozsah m/z: 30–370 amu
  - Rychlost skenování: 0,2 s

### 3.4.3 Vyhodnocení výsledků analýzy

Extrahované aromaticky aktivní látky byly identifikovány na základě srovnání hmotnostních spekter s knihovnou spekter. Každý vzorek byl analyzován dvakrát ( $n = 2$ ). Výsledky byly zpracovány pomocí programu Microsoft Office Excel 2010. V rámci statistického vyhodnocení byl pro naměřená data vypočten průměrný retenční čas jako aritmetický průměr retenčních časů pro jednotlivé analýzy ( $T_R$ ) a relativní odchylka ( $\delta T_R$ ) v procentech.



## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Tato práce je součástí rozsáhlého projektu, který probíhá ve spolupráci s Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně, a zároveň ve spolupráci s nejmenovaným výrobcem, který má zájem komerčně vyrábět sýry typu Moravský bochník. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně disponuje potřebným technologickým vybavením, jako základ byl zvolen standardní technologický postup pro výrobu ementálských sýrů, kde budou postupně zkoušeny různé varianty výrobních podmínek; cílem bude nalézt takové podmínky výroby, aby byl dosažen nutričně cenný a zároveň senzorycky atraktivní produkt. Během výroby modelových sýrů bude sledována řada fyzikálních, chemických, mikrobiologických a senzoryckých parametrů, v rámci této práce to bude stanovení aromaticky aktivních látek, které významným způsobem ovlivňují senzoryckou kvalitu vzorků.

První experimenty jsou zaměřeny na použití vhodných mikrobiálních kultur, resp. vhodného poměru jejich kombinace; hlavním cílem této práce tedy bude posoudit vliv různých kombinací mikrobiálních kultur na těkavé (aromaticky aktivní) látky v sýrech. Vzorky budou analyzovány v různých fázích zrání, v rámci této bakalářské práce byly analyzovány první vyrobené vzorky po 4 měsících zrání.

Jako metoda stanovení aromaticky aktivních látek v sýrech byla zvolena mikroextrakce pevnou fází v kombinaci s plynovou chromatografií a hmotnostní detekcí (Obrázek 8). Tato metoda je zavedena na ÚCHPBT a je používána na analýzu různých typů vzorků v rámci diplomových a bakalářských prací. Její optimalizace a validace pro sýry byla provedena již v předchozích bakalářských a diplomových pracích, lze uvést například práci Koubka [42]. Podmínky analýzy jsou uvedeny v kapitolách 3.4.2.1 a 3.4.2.2.

### 4.1 Výsledky stanovení aromaticky aktivních látek pomocí metody SPME-GC-MS

#### 4.1.1 Identifikace těkavých látek ve vzorcích sýrů

Identifikace těkavých látek byla provedena na základě srovnání hmotnostních spekter s dostupnou knihovnou spekter. Tabulka 5 a Tabulka 6 udávají přehled všech těkavých látek identifikovaných ve všech vzorcích sýrů. Hodnoty v tabulkách udávají pravděpodobnost shody dané sloučeniny s knihovnou spekter v %. Vzhledem k mírným odchylkám retenčních časů je uveden vždy průměr a relativní odchylka (ze všech měřených vzorků), která se pohybovala < 1 %, což lze považovat za výbornou reprodukovatelnost.

Popisu aroma těkavých látek se v současné době věnuje řada publikací zaměřených na sýry, ale i jiné výrobky. Naše výsledky tak byly porovnány s některými dostupnými publikacemi [35–41]. Látky označené symbolem \*\* byly v těchto studiích prokázány jako aromaticky aktivní, látky označené \* jsou pravděpodobně aromaticky aktivní, ale ověřené zdroje pro ně nebyly nalezeny.

Celkově bylo ve vzorcích sýrů identifikováno 129 těkavých sloučenin, z toho 35 alkoholů, 9 aldehydů, 24 ketonů, 16 karboxylových kyselin, 23 esterů, 1 ether, 16 uhlovodíků, 2 siřné a 3 dusíkaté sloučeniny (celkový souhrn identifikovaných sloučenin pro jednotlivé vzorky podle chemických skupin viz Tabulka 7).

Získané chromatogramy jsou součástí Příloh 1–7.

Vzhledem k tomu, že zatím nebyly k dispozici veškeré potřebné standardy, obsah těkavých látek ve vzorcích byl sledován pouze z hlediska kvalitativního. Je jasné, že pro lepší vyjádření rozdílů mezi vzorky, resp. změn během výroby a zrání sýrů, bude daleko zajímavější kvantitativní stanovení, proto bude následující práce zaměřena především na výběr a ověření vhodné metody kvantifikace, ta bude následně aplikována na vzorky sýrů pro vyjádření změn obsahu aromatických látek v závislosti na změnách různých podmínek výroby.

Jak je z Tabulek 5 a 6 patrné, pro lepší potvrzení přítomnosti některé sloučeniny by bylo lepší provést více měření jednoho vzorku, to však kvůli nedostatečnému množství vzorku sýra nebylo možné, proto byl každý vzorek proměřen jen dvakrát.

Kvůli vysoké citlivosti GC-MS bylo během analýzy detekováno také množství nečistot (viz Tabulka 8), které pravděpodobně pocházejí z SPME vlákna, případně ze separační kolony plynového chromatografu.

#### **4.1.2 Trvanlivost a uchovávání vzorků**

Jak již bylo zmíněno, aromaticky aktivní látky jsou látky těkavé a tedy poměrně málo stabilní. Pro jejich izolaci i stanovení je tedy třeba použít velmi šetrné metody. Nicméně k určitým ztrátám může docházet už během odběru a příp. uchovávání vzorku. Ideální by bylo vzorky podrobit analýze v čerstvém stavu (bez jakéhokoli konzervačního zásahu) okamžitě po odběru. Vzhledem k dlouhému transportu od výroby do laboratoře, množství analyzovaných vzorků a poměrně dlouhé době analýzy to však není vždy možné a vzorky je nutné nějakou dobu skladovat.

Pro tento účel bylo aplikováno jednoduché zmrazení a následné uchovávání při nízké teplotě až do doby analýzy. Tento postup je šetrný k matrici vzorku, vlivem nízké teploty dojde k zastavení nebo alespoň zpomalení probíhajících biochemických dějů a nedochází tak ke změnám složení těkavých látek ve vzorku a v neposlední řadě je předpoklad, že se zastaví nebo alespoň zpomalí i ztráty těchto látek.

Pro ověření příp. změn těkavých látek během skladování byl proveden jednoduchý skladovací pokus. Vybraný vzorek sýra (komerčně získaný Moravský bochník) byl podroben analýze okamžitě a po uchovávání ve zmraženém stavu po dobu 1 měsíce (výsledky viz Tabulka 6).

U každého vzorku byly provedeny dvě analýzy. Při prvním měření vzorku před zmražením bylo identifikováno 35 aromaticky aktivních látek, z toho bylo 12 alkoholů, 1 aldehyd, 8 ketonů, 10 karboxylových kyselin, 1 ether, 1 uhlovodík, 1 sirná a 1 dusíkatá sloučenina, estery nebyly přítomny. U druhého měření bylo detekováno 31 sloučenin, byl přítomný stejný počet aldehydů, ketonů a dusíkatých sloučenin, dále 10 alkoholů, 8 karboxylových kyselin, 1 uhlovodík a 2 estery. Sirné sloučeniny a ethery tentokrát detekovány nebyly.

Při první analýze vzorku po 1 měsíci zmrazení bylo detekováno 46 těkavých aromaticky aktivních sloučenin, při druhém měření však jen 26 látek, proto pro porovnání budou brány jen výsledky prvního měření. Při něm bylo identifikováno 13 alkoholů, 4 aldehydy, 7 ketonů, 8 karboxylových kyselin, 9 esterů, 2 uhlovodíky, 2 sirné a 1 dusíkatá sloučenina.

Mezi látky společné pro všechna uvedená měření, tedy před i po zmrazení vzorku, patří alkoholy methanol, ethanol, 3-methylbut-2-en-1-ol, pentan-3-ol, 2-methylpentan-3-ol,

linalool, hexan-1-ol, 2-ethylhexan-1-ol a benzylalkohol, dále kyselina octová, máselná, 3-methylmáselná, hexanová, heptanová, nonanová a dekanová, a další sloučeniny jako heptan-2-on, D-limonen, acetoin, 2,6-dimethylpyrazin, 2-hydroxypentan-3-on, benzaldehyd, oktyl ester mravenčí kyseliny, dimethylsulfoxid a tetra-6-pentyl-2H-pyran-2-on.

Některé látky, z nichž můžeme uvést butan-2-on, biacetyl, pentan-2,3-dion, nonan-2-on, citronellol a kyselinu oktanovou, byly identifikovány jen ve vzorku před zmražením. Naopak po zmražení se ve vzorku vyskytly některé látky, které předtím nebyly přítomny. Jedná se např. o undekan, dimethylsulfon, tetrahydro-6-propyl-2H-pyran-2-on, benzyl ester benzoové kyseliny a methyl estery máselné, hexanové a oktanové kyseliny.

Vzhledem k nejednoznačným výsledkům nelze s určitostí říci, zda zmražením vzorků dochází k výrazným ztrátám těkavých sloučenin, je však patrné, že během zmražení pravděpodobně probíhají v malé míře jisté metabolické procesy, které ale bude možné lépe posoudit až s možností i kvantitativního stanovení.

#### **4.1.3 Srovnání identifikovaných sloučenin ve vzorcích komerčních sýrů**

Sýry typu Moravský bochník patří do skupiny tvrdých sýrů s vysokodohřívanou sýřeninou; jejich výroba i vlastnosti jsou podobné hlavnímu zástupci této skupiny, Ementálu.

Vzhledem k tomu, že o Moravském bochníku je dostupných málo publikací, resp. žádná, která by se věnovala problematice senzorické kvality a obsahu aromatických látek, byl zvolen Ementál jako standard pro porovnání identifikovaných látek s našimi modelovými vzorky. Lze předpokládat, že se sýry budou podobat obsahem aromatických sloučenin.

Proto byly zakoupeny dva komerčně vyrobené sýry, klasický Ementál a Moravský bochník, které byly podrobeny analýze za stejných podmínek (výsledky viz Tabulka 6).

Jak již bylo zmíněno výše (kap. 2.3) technologický proces výroby těchto dvou sýrů se mírně odlišuje. Při výrobě Ementálu se používá vyšší teplota dohřívání, celková doba zpracování i zrání je delší, a navíc část zrání probíhá v kvasném sklepe, tj. při vyšší teplotě (20–26 °C) [2, 3]. Lze v něm tedy očekávat pokročilejší biochemické procesy a bohatší spektrum identifikovaných sloučenin.

Tento předpoklad se však jednoznačně nepotvrdil. V komerčně zakoupeném sýru Président Emmental bylo identifikováno při prvním měření 30 a při druhém měření 42 aromaticky aktivních látek, u sýru Madeta Moravský bochník jich pak bylo při prvním stanovení 35 a při druhém 31. Z kvalitativního hlediska je tedy aromatický profil obou sýrů zhruba srovnatelný a zajímavější pravděpodobně opět bude sledovat změny obsahu identifikovaných sloučenin.

Porovnáním výsledků se dá říci, že významnou roli v obou sýrech hrají především alkoholy, ketony a karboxylové kyseliny, které jsou nejvíce zastoupeny. Mezi látky nacházející se v obou typech komerčně zastoupených sýrů patří butan-2-on, ethanol, biacetyl, butyl ester octové kyseliny, heptan-2-on, D-limonen, 3-methylbut-3-en-1-ol, acetoin, pentan-3-ol, 2-methylpentan-3-ol, hexan-1-ol, nonan-2-on, kyselina octová, 2-ethylhexan-1-ol, benzaldehyd, oktyl ester mraveční kyseliny, dimethylsulfoxid, kyselina máselná, kyselina pentanová, citronellol, geraniol, kyselina hexanová, benzylalkohol, kyselina heptanová, kyselina oktanová, kyselina nonanová, tetrahydro-6-pentyl-2H-pyran-on a kyselina dekanová.

Každý ze sýrů pak obsahoval i některé látky, které u druhého vzorku nebyly detekovány. U Moravského bochníku se jedná o methanol, penta-2,3-dion, 3-methylbut-2-en-1-ol, 2,6-dimethylpyrazin, linalool a kyselinu 3-methyl máselnou. Naproti tomu v Emmentalu se vyskytoval butan-1-ol, 2-methylbutan-1-ol, 3,5-dimethylheptan-4-ol, 2,6-dimethylheptan-4-ol, kyselina 2-methylmáselná, kyselina 4-methylpentanová a podle očekávání kyselina propionová, která vzniká v důsledku působení propionové kultury, která se při výrobě sýrů ementálského typu přidává za účelem vzniku pravidelných ok v sýru pomocí CO<sub>2</sub> vznikajícího při fermentaci mléčnanu [16].

#### 4.1.4 Srovnání identifikovaných sloučenin ve vzorcích modelových sýrů

Jak již bylo zmíněno, hlavním cílem této práce bylo posoudit vliv aplikace různých poměrů mikrobiálních kultur použitých pro výrobu modelových sýrů.

Obecně se při výrobě sýrů s vysokodohřívanou sýřeninou do mléka přidává mezofilní a termofilní kultura a v případě ementálských sýrů i propionová kultura (viz kap. 2.3.1). Zajímavé je, že se z dostupné literatury nepodařilo bezpečně zjistit, zda jsou propionové bakterie nezbytné i pro výrobu sýrů typu Moravský bochník; tyto sýry nemají oka, a lze tedy předpokládat, že aplikace propionové kultury není nutná.

Pro výrobu modelových vzorků pro tuto práci byla proto použita klasická mezofilní aromatická kultura a dva typy termofilních kultur. Jejich složení je uvedeno v kap. 3.2. Celkem byly analyzovány 4 vzorky vyrobené s použitím 4 různých kombinací uvedených mikrobiálních kultur (viz Tabulka 3). Vzorky V1–V3 jsou velmi podobné, ve směsi převažovala mezofilní kultura; u vzorku V2 byl mírně zvýšen obsah termofilní kultury LH B02 (*Lactobacillus helveticus*), u vzorku V3 naopak nepatrně zvýšen obsah STI-12 (*Streptococcus thermophilus*); u vzorku V4 byla provedena radikální změna, kdy ve směsi tentokrát převažovala termofilní kultura LH B02.

Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 5. Jak je z ní patrné, mezi jednotlivými modelovými vzorky sýrů V1–V4 se vyskytují rozdíly v druhu identifikovaných látek. Z pohledu jednotlivých chemických skupin (viz Tabulka 7) byly ve všech vzorcích nejvíce zastoupeny především alkoholy a karboxylové kyseliny.

Ke sloučeninám, které byly identifikovány ve všech vzorcích modelových sýrů, patří z alkoholů methanol, ethanol, hexan-1-ol, okt-1-en-3-ol, 2-ethylhexan-1-ol, butan-2,3-diol, citronellol, geraniol a benzylalkohol, dále kyseliny octová, máselná, hexanová, heptanová, oktanová a dekanová, mezi estery to jsou ethyl ester máselné kyseliny, butyl ester octové kyseliny a ethyl ester hexanové kyseliny; a mimo to množství dalších sloučenin jako biacetyl,  $\beta$ -myrcen, 3-methylbut-2-en-1-ol, heptan-2-on, D-limonen, acetoin, nonan-2-on, nonanal, benzaldehyd, dimethylsulfon a tetrahydro-6-pentyl-2H-pyran-2-on.

Průměrně ze dvou měření každého vzorku bylo nejvíce aromaticky aktivních látek identifikováno ve vzorku V2, naopak nejméně ve vzorku V3. Navíc ve vzorku V2 byly identifikovány při obou měřeních některé látky, které se u jiných modelových vzorků nevyskytovaly. K těmto sloučeninám patří heptan-3-on, pentan-3-ol, oktyl ester mravenčí kyseliny, undekan-2-on a kyselina 2-methylheptanová. U vzorku V1 byl takto identifikován navíc jen 2-propyl ester octové kyseliny. Překvapivě nebyla nalezena výrazná odlišnost vzorku V4; vzhledem k vyšší proteolytické aktivitě termofilní kultury [2, 3] by bylo možné

ve vzorku V4 očekávat bohatší spektrum identifikovaných těkavých látek. Tento předpoklad se však jednoznačně nepotvrdil, je však možné, že převaha termofilní kultury bude mít vliv spíše na zvýšený obsah identifikovaných sloučenin.

#### **4.1.5 Srovnání identifikovaných sloučenin ve vzorcích modelových vs. komerčních sýrů**

Jak již bylo zmíněno v kap. 4.1.3, pro porovnání s našimi modelovými vzorky byly analyzovány i dva komerčně vyrobené sýry, klasický Ementál a Moravský bochník. Tyto vzorky by měly být z hlediska senzorického vhodné ke konzumaci. Komerční sýry mají deklarované hodnoty 60 % sušiny a 45 % tuku v sušině, stejně jako vyrobené modelové sýry.

Ve vzorku V1 bylo při prvním měření identifikováno 49 a při druhém 39 sloučenin, u vzorku V2 jich bylo detekováno při prvním měření 52 a při druhém 42, ve vzorku V3 pak 37 a 40 a ve vzorku V4 při prvním měření 44 a při druhém 40. Ve vzorku Président Emmental bylo stanoveno při prvním měření 30 a při druhém 42 sloučenin, ve vzorku Madeta Moravský bochník pak bylo kvantifikováno při prvním měření 35 a při druhém 31 sloučenin.

Ke sloučeninám, které byly přítomny jak v modelových vzorcích, tak v komerčně zakoupených sýrech patří ethanol, biacetyl, butyl ester octové kyseliny, heptan-2-on, D-limonen, acetoin, hexan-1-ol, nonan-2-on, 2-ethylhexan-1-ol, benzaldehyd, citronellol, geraniol, benzylalkohol, tetrahydro-6-pentyl-2H-pyran-2-on a kyseliny octová, máselná, hexanová, heptanová, oktanová a dekanová.

Ethyl ester hexanové kyseliny, nonanal a dimethylsulfon byly nalezeny ve všech vzorcích kromě komerčního Moravského bochníku; sloučeniny methanol a 3-methylbut-2-en-1-ol byly zase identifikovány ve všech vzorcích kromě komerčního Ementálu.

Butan-2on a 3-methylbut-3-en-1-ol se nacházely pouze v komerčních vzorcích, naproti tomu ethyl ester máselné kyseliny,  $\beta$ -myrcen, okt-1-en-3-ol a butan-2-dion pouze ve vzorcích modelových. Zajímavostí je, že pentan-3-ol a oktyl ester mravenčí kyseliny, vyskytující se v obou komerčně zakoupených vzorcích, byly detekovány jen ve vzorku V2.

Tabulka 5a: Přehled aromaticky aktivních látek identifikovaných ve vzorcích V1– V4

| Sloučeniny                     | T <sub>R</sub><br>[min] | δT <sub>R</sub><br>[%] | V1m <sub>1</sub> | V1m <sub>2</sub> | V2m <sub>1</sub> | V2m <sub>2</sub> | V3m <sub>1</sub> | V3m <sub>2</sub> | V4m <sub>1</sub> | V4m <sub>2</sub> |         |
|--------------------------------|-------------------------|------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|---------|
| Methanol                       | 4,10                    | 0,21                   | 36,8             | 33,6             | 24,9             | 42,7             | 61,0             | 36,3             | 42,0             | 33,9             | ** [37] |
| Kyselina 2-hydroxyoctová       | 4,67                    | –                      | –                | 93,5             | –                | –                | –                | –                | –                | –                | *       |
| Ethanol                        | 4,86                    | 0,10                   | 59,1             | 75,8             | 76,5             | 58,4             | 59,4             | 54,4             | 69,6             | 45,1             | ** [37] |
| Biacetyl (butan-2,3-dion)      | 6,13                    | 0,11                   | 65,8             | 57,9             | 66,3             | –                | 62,9             | 58,3             | 23,1             | –                | ** [37] |
| 3-methylbutan-2-on             | 6,13                    | –                      | –                | –                | –                | 39,2             | –                | –                | –                | 14,8             | ** [37] |
| Ethyl ester máselné kyseliny   | 7,60                    | 0,12                   | 81,7             | 85,6             | 83,9             | 26,5             | 83,1             | –                | 78,2             | 52,0             | ** [35] |
| Isobutyl ester octové kyseliny | 8,78                    | –                      | –                | –                | –                | –                | –                | –                | –                | 69,2             | *       |
| Butyl ester octové kyseliny    | 8,82                    | 0,13                   | 52,1             | –                | 53,0             | –                | 72,9             | 88,5             | 59,0             | –                | ** [37] |
| Hexanal                        | 9,19                    | 0,14                   | 35,1             | –                | –                | –                | 61,7             | 39,0             | 50,1             | 30,9             | ** [37] |
| 2,5,9-trimethyldekan           | 9,20                    | –                      | –                | –                | –                | 19,8             | –                | –                | –                | –                | *       |
| 2,5,6-trimethyldekan           | 9,49                    | –                      | –                | –                | –                | 17,4             | –                | –                | –                | –                | *       |
| 2-methylbutan                  | 9,50                    | –                      | 13,2             | –                | –                | –                | –                | –                | –                | –                | *       |
| β-pinen                        | 9,75                    | –                      | –                | –                | –                | –                | 30,8             | –                | –                | –                | *       |
| β-felandren                    | 10,18                   | –                      | –                | –                | –                | –                | –                | –                | –                | 37,1             | *       |
| γ-terpinen                     | 11,29                   | –                      | –                | –                | –                | –                | –                | –                | –                | 16,3             | *       |
| 3-karen                        | 11,53                   | –                      | –                | –                | 11,9             | –                | –                | –                | –                | –                | *       |
| Butan-1-ol                     | 11,65                   | –                      | –                | –                | –                | –                | –                | –                | –                | 21,5             | ** [37] |
| Heptan-3-on                    | 11,93                   | 0,25                   | –                | –                | 40,1             | 69,5             | –                | –                | –                | –                | ** [37] |
| β-Myrcen                       | 12,29                   | 0,03                   | 69,2             | 57,2             | 56,2             | 75,9             | –                | 59,3             | 43,7             | –                | *       |
| Heptan-2-on                    | 13,13                   | 0,08                   | 45,2             | 52,3             | 60,0             | 56,5             | 57,0             | 49,5             | 60,4             | 49,6             | ** [37] |
| Heptan-1-al                    | 13,29                   | –                      | –                | –                | –                | –                | 49,2             | –                | –                | –                | ** [37] |
| 4-methylnonan                  | 13,33                   | –                      | –                | –                | –                | 5,6              | –                | –                | –                | –                | *       |
| Dodekan                        | 13,34                   | 0,03                   | 9,7              | –                | 22,9             | –                | –                | –                | 8,6              | –                | *       |
| D-limonen                      | 13,67                   | 0,18                   | 49,9             | 43,8             | 55,3             | 41,6             | 48,3             | 48,9             | 37,3             | 39,4             | ** [39] |
| 3-methylbutan-1-ol             | 14,13                   | 0,05                   | 24,6             | 10,3             | –                | –                | –                | –                | 42,5             | –                | ** [37] |

Tabulka 5b: Přehled aromaticky aktivních látek identifikovaných ve vzorcích V1– V4 (pokračování)

| Sloučeniny                                | T <sub>R</sub><br>[min] | δT <sub>R</sub><br>[%] | V1m <sub>1</sub> | V1m <sub>2</sub> | V2m <sub>1</sub> | V2m <sub>2</sub> | V3m <sub>1</sub> | V3m <sub>2</sub> | V4m <sub>1</sub> | V4m <sub>2</sub> |         |
|---|-------------------------|------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|---------|
| Pentan-1-ol                               | 14,14                   | 0,05                   | 23,6             | –                | 32,8             | 25,9             | 18,6             | –                | –                | –                | ** [37] |
| Ethyl ester hexanové kyseliny             | 15,25                   | 0,09                   | 48,6             | 38,6             | 43,9             | –                | 34,5             | –                | 51,2             | 56,5             | ** [37] |
| Ethyl ester 4-methylpentanové kyseliny    | 15,26                   | –                      | –                | –                | –                | 33,8             | –                | –                | –                | –                | *       |
| 5-methyl-1-fenylhexan-1-on                | 15,79                   | –                      | –                | –                | –                | –                | –                | –                | –                | 23,9             | *       |
| Acetoin (3-hydroxybutan-2-on)             | 17,63                   | 0,04                   | 85,4             | 85,7             | 80,2             | 81,8             | 83,0             | 84,0             | 83,0             | 80,7             | ** [37] |
| 3-methylbut-2-en-1-ol                     | 19,13                   | 0,03                   | –                | 74,8             | 70,8             | –                | 50,6             | –                | 68,9             | –                | ** [37] |
| 2,6-dimethylpyrazin                       | 19,34                   | –                      | –                | 45,4             | –                | –                | –                | –                | –                | –                | ** [38] |
| Ethyl ester 2-hydroxymáselné kyseliny     | 20,09                   | –                      | –                | 22,3             | –                | –                | –                | –                | –                | –                | *       |
| Pantan-3-ol                               | 20,09                   | 0,02                   | –                | –                | 32,8             | 56,5             | –                | –                | –                | –                | *       |
| Hexan-1-ol                                | 20,42                   | 0,03                   | 19,2             | 12,4             | 15,2             | –                | 28,8             | 15,9             | 34,2             | 48,5             | ** [37] |
| 2-methylpent-1-en                         | 20,43                   | –                      | –                | –                | 15,8             | –                | –                | –                | –                | –                | *       |
| 2-hydroxypentan-3-on                      | 20,78                   | –                      | –                | –                | –                | –                | –                | –                | –                | 41,4             | *       |
| 4-methylpent-1-en-3-ol                    | 20,80                   | –                      | –                | –                | –                | 21,9             | –                | –                | –                | –                | *       |
| Nonan-2-on                                | 21,98                   | 0,03                   | 44,8             | 58,0             | 57,8             | 56,3             | 69,8             | 49,6             | 52,9             | 62,2             | ** [37] |
| Nonanal                                   | 22,20                   | 0,03                   | 44,5             | 32,7             | 54,3             | 35,5             | 67,2             | 46,3             | 42,1             | 37,4             | ** [37] |
| 3,5-dimethylfenyl ester oktanové kyseliny | 22,54                   | –                      | –                | –                | 12,1             | –                | –                | –                | –                | –                | *       |
| Trimethylpyrazin                          | 22,54                   | –                      | –                | 57,2             | –                | 52,5             | –                | –                | –                | –                | ** [38] |
| Okt-3-en-2-on                             | 22,81                   | 0,02                   | 20,1             | 46,9             | –                | 33,3             | –                | –                | –                | –                | *       |
| β-thujon                                  | 23,30                   | 0,02                   | 40,1             | –                | 40,9             | –                | –                | 42,9             | –                | –                | *       |
| Ethyl ester oktanové kyseliny             | 23,86                   | 0,03                   | 57,1             | –                | –                | –                | –                | 71,0             | 58,4             | –                | *       |
| Okt-1-en-3-ol                             | 24,57                   | 0,04                   | 67,2             | 53,6             | 65,9             | 50,0             | 66,8             | –                | 25,1             | 66,7             | ** [35] |
| Heptan-1-ol                               | 24,77                   | 0,04                   | –                | –                | 11,7             | 25,6             | –                | –                | –                | 30,7             | ** [37] |
| Kyselina octová                           | 25,16                   | 0,12                   | 53,6             | 55,4             | 51,6             | 45,1             | 52,4             | 47,0             | 54,0             | 45,1             | ** [37] |
| 3,7-dimethylokt-6-enal                    | 25,84                   | –                      | –                | –                | –                | –                | –                | 49,4             | 39,4             | –                | *       |
| 7-hydroxy-3,7-dimethyloktanal             | 25,90                   | –                      | 11,3             | –                | –                | –                | –                | –                | –                | –                | *       |

Tabulka 5c: Přehled aromaticky aktivních látek identifikovaných ve vzorcích V1– V4 (pokračování)

| Sloučeniny                           | T <sub>R</sub><br>[min] | δT <sub>R</sub><br>[%] | V1m <sub>1</sub> | V1m <sub>2</sub> | V2m <sub>1</sub> | V2m <sub>2</sub> | V3m <sub>1</sub> | V3m <sub>2</sub> | V4m <sub>1</sub> | V4m <sub>2</sub> |         |
|--------------------------------------|-------------------------|------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|---------|
| 2-ethylhexan-1-ol                    | 26,23                   | 0,03                   | 53,2             | 35,8             | 32,4             | 41,3             | 37,6             | 35,3             | 32,2             | 36,6             | ** [37] |
| Kafr                                 | 27,37                   | –                      | –                | –                | 37,0             | –                | –                | 69,0             | –                | –                | *       |
| Nonan-2-ol                           | 27,59                   | 0,03                   | 7,2              | –                | –                | –                | 39,9             | –                | 41,7             | 50,1             | ** [37] |
| Undekan-1-ol                         | 27,61                   | –                      | –                | 8,8              | 6,2              | –                | –                | –                | –                | –                | *       |
| Benzaldehyd                          | 28,10                   | 0,03                   | 69,8             | 42,9             | 41,7             | 47,6             | 43,0             | 52,3             | 41,2             | 56,4             | ** [36] |
| Butan-2,3-diol                       | 28,85                   | 0,02                   | 39,3             | 38,1             | 39,3             | 42,5             | 43,1             | 40,8             | 45,9             | 44,6             | ** [37] |
| Linalool                             | 29,20                   | 0,02                   | 56,0             | –                | –                | –                | –                | –                | 47,6             | 31,1             | ** [39] |
| Kyselina propionová                  | 29,50                   | –                      | 54,6             | –                | –                | –                | –                | –                | –                | –                | ** [37] |
| 2-propylpentyl ester octové kyseliny | 29,74                   | 0,07                   | 20,4             | 27,5             | –                | –                | –                | –                | –                | –                | *       |
| Oktan-1-ol                           | 29,74                   | 0,05                   | –                | –                | 10,3             | –                | 18,1             | –                | 28,2             | 20,5             | ** [37] |
| Oktyl ester mravenčí kyseliny        | 29,76                   | –                      | –                | –                | 18,9             | 11,3             | –                | –                | –                | –                | ** [41] |
| Dimethylsulfoxid                     | 30,66                   | 0,08                   | 58,3             | 62,7             | 60,8             | –                | –                | –                | 77,2             | –                | *       |
| Karyofylen                           | 31,79                   | –                      | –                | –                | –                | –                | –                | 19,4             | –                | –                | *       |
| Undekan-2-on                         | 32,33                   | –                      | –                | –                | 31,9             | 47,1             | –                | –                | –                | –                | ** [37] |
| Ethyl ester dekanové kyseliny        | 35,36                   | –                      | –                | –                | 68,2             | –                | –                | –                | –                | –                | ** [37] |
| Kyselina másečná                     | 35,81                   | 0,06                   | 51,8             | 49,6             | 60,9             | 58,1             | 76,0             | 60,2             | 74,7             | 67,9             | ** [37] |
| Humulen                              | 37,12                   | –                      | –                | –                | –                | –                | –                | 42,2             | –                | –                | *       |
| 3,7-dimethyloktan-1-ol               | 37,40                   | 0,02                   | 18,4             | –                | 9,9              | –                | –                | 22,7             | 20,1             | –                | *       |
| (Furan-3-yl)methanol                 | 37,70                   | 0,05                   | –                | –                | –                | 47,9             | 61,3             | –                | –                | 50,2             | *       |
| (Furan-2-yl)methanol                 | 37,71                   | –                      | –                | 36,8             | –                | –                | –                | –                | –                | –                | *       |
| Kyselina 3-methylmásečná             | 38,85                   | –                      | –                | –                | –                | –                | –                | 55,8             | –                | –                | ** [37] |
| Kyselina 2-methylmásečná             | 39,10                   | –                      | 62,8             | –                | –                | –                | –                | –                | –                | –                | ** [37] |
| Kyselina 2-methylheptanová           | 39,14                   | –                      | –                | –                | 65,2             | 26,6             | –                | –                | –                | –                | *       |
| Karvon                               | 41,69                   | 0,05                   | 42,1             | 77,9             | 69,7             | 40,3             | –                | –                | 25,6             | 59,0             | ** [39] |
| Tridekan-7-on                        | 41,71                   | –                      | –                | –                | –                | –                | 55,4             | –                | –                | –                | *       |



Tabulka 5d: Přehled aromaticky aktivních látek identifikovaných ve vzorcích V1– V4 (pokračování)

| Sloučeniny                              | T <sub>R</sub><br>[min] | δT <sub>R</sub><br>[%] | V1m <sub>1</sub> | V1m <sub>2</sub> | V2m <sub>1</sub> | V2m <sub>2</sub> | V3m <sub>1</sub> | V3m <sub>2</sub> | V4m <sub>1</sub> | V4m <sub>2</sub> |         |
|---|-------------------------|------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|---------|
| Kyselina pentanová                      | 43,29                   | 0,22                   | 59,4             | –                | –                | –                | 75,0             | 66,2             | 74,5             | –                | ** [37] |
| Pent-3-en-1-ol                          | 43,49                   | –                      | –                | –                | –                | –                | –                | –                | 13,2             | –                | *       |
| Citronellol                             | 43,95                   | 0,03                   | 32,6             | 32,8             | 32,2             | 39,4             | 39,4             | 37,9             | 36,8             | 37,1             | *       |
| Tridekan-2-on                           | 45,91                   | 0,01                   | 37,7             | –                | –                | –                | –                | 52,5             | –                | –                | *       |
| 2,4,5-trimethylbenzaldehyd              | 46,89                   | –                      | –                | –                | –                | –                | –                | –                | 12,8             | –                | *       |
| α-isomethyljonon                        | 47,60                   | 0,02                   | –                | –                | 39,5             | –                | –                | –                | 17,4             | 67,7             | *       |
| Geraniol                                | 47,92                   | 0,03                   | 46,7             | 25,8             | 38,1             | 41,1             | –                | 47,0             | 60,4             | 23,3             | *       |
| Kyselina hexanová                       | 48,44                   | 0,02                   | 54,2             | 46,8             | 53,1             | 53,6             | 55,3             | 50,6             | 54,4             | 69,4             | ** [37] |
| Benzylalkohol                           | 49,26                   | 0,02                   | 36,5             | 38,2             | 48,3             | 35,4             | 39,8             | 44,6             | 44,7             | 45,2             | ** [36] |
| Dimethylsulfon (Methylsulfonylmethan)   | 50,35                   | 0,02                   | 94,5             | 95,1             | 93,1             | 92,0             | 94,0             | 95,4             | 95,4             | 96,2             | *       |
| 2-fenylethanol                          | 50,69                   | 0,02                   | –                | –                | –                | 57,0             | 41,5             | –                | –                | –                | ** [36] |
| Kyselina heptanová                      | 52,85                   | 0,09                   | 84,6             | 82,9             | 77,3             | 79,4             | 80,7             | 75,3             | 71,1             | 87,8             | ** [37] |
| Fenol                                   | 54,65                   | 0,01                   | 33,6             | –                | 29,2             | –                | –                | 17,9             | –                | –                | ** [40] |
| Kyselina oktanová                       | 56,82                   | 0,01                   | 68,6             | 57,3             | 66,1             | 58,9             | 55,4             | 77,8             | 80,6             | 51,6             | ** [37] |
| Propyl ester 2-hydroxybenzoové kyseliny | 57,77                   | –                      | –                | –                | 5,7              | –                | –                | –                | –                | –                | *       |
| 3-methyl ester pentanové kyseliny       | 58,85                   | –                      | –                | –                | –                | –                | –                | 26,0             | –                | –                | *       |
| Kyselina nonanová                       | 60,40                   | –                      | 65,9             | –                | 72,9             | –                | –                | 65,7             | –                | –                | ** [37] |
| Tetrahydro-6-pentyl-2H-pyran-2-on       | 60,80                   | 0,01                   | 57,5             | 65,0             | 70,5             | 57,0             | 73,2             | 75,9             | 68,0             | 64,0             | *       |
| Thymol                                  | 61,67                   | –                      | –                | –                | –                | –                | –                | 29,1             | –                | –                | ** [40] |
| Kyselina dekanová                       | 63,71                   | 0,02                   | 68,8             | 55,6             | 70,1             | 79,1             | 87,3             | 76,0             | 66,2             | 72,3             | ** [37] |

Značení vzorků viz Tabulka 4; hodnoty v tabulkách udávají pravděpodobnost shody dané sloučeniny s knihovnou spekter v %; \*\* látka aromaticky aktivní; \* látka pravděpodobně aromaticky aktivní

Tabulka 6a: Přehled aromaticky aktivních látek identifikovaných ve vzorcích sýrů zakoupených v běžné tržní síti

| Sloučeniny                             | T <sub>R</sub><br>[min] | δT <sub>R</sub><br>[%] | Em <sub>1</sub> | Em <sub>2</sub> | MBm <sub>1</sub> | MBm <sub>2</sub> | MBZm <sub>1</sub> | MBZm <sub>2</sub> |         |
|--|-------------------------|------------------------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|-------------------|-------------------|---------|
| Methanol                               | 3,92                    | 0,40                   | –               | –               | 85,0             | 78,6             | 33,5              | –                 | ** [37] |
| Butan-2-on                             | 4,18                    | 0,18                   | 44,9            | 14,6            | 54,5             | 52,8             | –                 | –                 | ** [37] |
| Kyselina 2-hydroxyoctová               | 4,84                    | –                      | –               | –               | –                | –                | –                 | 19,3              | *       |
| 2-hydroxypropanamid                    | 4,84                    | –                      | 59,7            | –               | –                | –                | –                 | –                 | *       |
| Ethanol                                | 4,85                    | 0,26                   | –               | 37,2            | 70,5             | 69,9             | 50,0              | –                 | ** [37] |
| Methyl ester máselné kyseliny          | 6,11                    | 0,08                   | –               | –               | –                | –                | 95,0              | 93,2              | ** [37] |
| Biacetyl (butan-2,3-dion)              | 6,12                    | 0,40                   | –               | 45,2            | 53,1             | 47,2             | –                 | –                 | ** [37] |
| Pentan-2,3-dion                        | 8,55                    | 0,18                   | –               | –               | 80,8             | 84,8             | –                 | –                 | ** [37] |
| Butyl ester octové kyseliny            | 8,77                    | 0,06                   | –               | 54,7            | –                | 27,4             | –                 | –                 | ** [37] |
| Undekan                                | 9,10                    | 0,88                   | –               | –               | –                | –                | 25,2              | 20,6              | *       |
| Butan-1-ol                             | 11,58                   | 0,04                   | 50,5            | 49,2            | –                | –                | –                 | –                 | ** [37] |
| Heptan-2-on                            | 13,09                   | 0,08                   | 55,7            | 54,5            | 71,7             | 51,8             | 49,3              | 60,8              | ** [37] |
| Methyl ester hexanové kyseliny         | 13,29                   | 0,26                   | –               | –               | –                | –                | 89,1              | 86,8              | ** [37] |
| D-limonen                              | 13,66                   | 0,15                   | 47,4            | 43,5            | 47,2             | 44,6             | 31,2              | –                 | ** [39] |
| 2-methylbutan-1-ol                     | 14,12                   | 0,04                   | 53,5            | 65,8            | –                | –                | –                 | –                 | ** [37] |
| 3-methylbutan-1-ol                     | 14,14                   | –                      | –               | –               | –                | –                | 33,0              | –                 | ** [37] |
| 2-methylbut-1-en                       | 14,16                   | –                      | –               | –               | –                | –                | –                 | 18,5              | *       |
| Ethyl ester 3-methylpentanové kyseliny | 15,20                   | –                      | –               | –               | –                | –                | –                 | 35,1              | *       |
| Ethyl ester hexanové kyseliny          | 15,24                   | 0,13                   | –               | 48,1            | –                | –                | 45,2              | –                 | ** [37] |
| Pentan-1-ol                            | 15,94                   | –                      | –               | –               | 21,4             | –                | –                 | –                 | ** [37] |
| 3-methylbut-3-en-1-ol                  | 15,97                   | 0,03                   | 35,6            | 12,2            | –                | 28,5             | –                 | –                 | ** [37] |
| Acetoin (3-hydroxybutan-2-on)          | 17,62                   | 0,06                   | 79,4            | 84,5            | 84,7             | 82,4             | 71,4              | 84,0              | ** [37] |
| 1-hydroxypropan-2-on                   | 18,36                   | –                      | –               | 78,7            | –                | –                | –                 | –                 | *       |
| Heptan-2-ol                            | 18,95                   | –                      | –               | –               | –                | –                | 23,7              | –                 | ** [37] |
| 3-methylbut-2-en-1-ol                  | 19,10                   | 0,06                   | –               | –               | 76,3             | 76,0             | 66,8              | –                 | ** [37] |

Tabulka 6b: Přehled aromaticky aktivních látek identifikovaných ve vzorcích sýrů zakoupených v běžné tržní síti (pokračování)

| Sloučeniny                               | T <sub>R</sub><br>[min] | δT <sub>R</sub><br>[%] | Em <sub>1</sub> | Em <sub>2</sub> | MBm <sub>1</sub> | MBm <sub>2</sub> | MBZm <sub>1</sub> | MBZm <sub>2</sub> |         |
|--|-------------------------|------------------------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|-------------------|-------------------|---------|
| 2,6-dimethylpyrazin                      | 19,32                   | 0,07                   | –               | –               | 50,7             | 42,6             | 68,9              | –                 | ** [38] |
| 6-methylhept-5-en-2-on                   | 19,82                   | –                      | –               | –               | –                | –                | 56,5              | –                 | ** [41] |
| 2-methylpentan-3-ol                      | 20,06                   | 0,02                   | 17,2            | –               | –                | 15,3             | 17,9              | –                 | *       |
| Pantan-3-ol                              | 20,06                   | 0,08                   | –               | 23,6            | 13,8             | –                | –                 | 23,7              | *       |
| Hexan-1-ol                               | 20,41                   | 0,05                   | 28,5            | –               | 21,7             | –                | 37,3              | 14,5              | ** [37] |
| 2-hydroxypentan-3-on                     | 20,78                   | 0,05                   | –               | –               | –                | 39,4             | 32,0              | 43,1              | *       |
| Nonan-2-on                               | 21,96                   | 0,03                   | 57,1            | 48,5            | 44,4             | 57,5             | –                 | –                 | ** [37] |
| Methyl ester oktanové kyseliny           | 21,99                   | 0,02                   | –               | –               | –                | –                | 45,2              | 63,9              | ** [37] |
| Nonanal                                  | 22,18                   | 0,05                   | –               | 28,1            | –                | –                | 50,9              | –                 | ** [37] |
| 2-methylpropyl ester propionové kyseliny | 22,50                   | –                      | –               | 16,4            | –                | –                | –                 | –                 | *       |
| 2,2-dimethylheptan-3-on                  | 23,20                   | –                      | 39,9            | –               | –                | –                | –                 | –                 | *       |
| Ethyl ester oktanové kyseliny            | 23,85                   | –                      | –               | 56,6            | –                | –                | 48,9              | –                 | *       |
| 3,5-dimethylheptan-4-ol                  | 24,09                   | –                      | 44,2            | 40,8            | –                | –                | –                 | –                 | *       |
| Kyselina octová                          | 25,34                   | 0,55                   | 45,2            | 55,5            | 54,1             | 74,6             | 62,2              | 58,2              | ** [37] |
| 2,6-dimethylheptan-4-ol                  | 25,54                   | –                      | 23,2            | 11,7            | –                | –                | –                 | –                 | *       |
| 2-ethylhexan-1-ol                        | 26,21                   | 0,06                   | –               | 40,4            | 38,1             | 31,4             | 33,9              | –                 | ** [37] |
| 2-propylpentan-1-ol                      | 26,22                   | –                      | –               | –               | –                | –                | –                 | 18,4              | *       |
| Dekanal                                  | 26,67                   | –                      | –               | –               | –                | –                | 39,1              | –                 | ** [37] |
| Undekan-1-ol                             | 27,61                   | –                      | 9,8             | –               | –                | –                | –                 | –                 | *       |
| Benzaldehyd                              | 28,08                   | 0,04                   | 51,1            | –               | 47,9             | 48,6             | 51,0              | 44,8              | ** [36] |
| Butan-2,3-diol                           | 28,86                   | –                      | –               | –               | –                | –                | 63,2              | –                 | ** [37] |
| Kyselina propionová                      | 28,97                   | 0,03                   | 77,4            | 57,9            | –                | –                | –                 | –                 | ** [37] |
| Linalool                                 | 29,18                   | 0,08                   | –               | –               | 46,8             | 19,4             | 48,5              | –                 | ** [39] |
| Oktyl ester mravenčí kyseliny            | 29,69                   | 0,13                   | –               | 39,7            | –                | 34,4             | 34,3              | –                 | ** [41] |
| Dimethylsulfoxid                         | 30,63                   | 0,09                   | –               | 58,4            | 62,9             | –                | 77,4              | –                 | *       |

Tabulka 6c: Přehled aromaticky aktivních látek identifikovaných ve vzorcích sýrů zakoupených v běžné tržní síti (pokračování)

| Sloučeniny                            | T <sub>R</sub><br>[min] | δT <sub>R</sub><br>[%] | Em <sub>1</sub> | Em <sub>2</sub> | MBm <sub>1</sub> | MBm <sub>2</sub> | MBZm <sub>1</sub> | MBZm <sub>2</sub> |         |
|---------------------------------------|-------------------------|------------------------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|-------------------|-------------------|---------|
| Kyselina 2-methylpropionová           | 31,47                   | –                      | –               | –               | 70,8             | –                | –                 | –                 | ** [37] |
| Methyl ester dekanové kyseliny        | 32,10                   | –                      | –               | –               | –                | –                | 32,5              | –                 | *       |
| Undekan-2-on                          | 32,29                   | –                      | –               | 58,0            | –                | –                | –                 | –                 | ** [37] |
| Kyselina 4-hydroxymáselná             | 34,85                   | –                      | –               | –               | –                | –                | 67,9              | –                 | *       |
| Kyselina máselná                      | 35,83                   | 0,51                   | 58,9            | 53,7            | 64,4             | 54,4             | 78,4              | 45,4              | ** [37] |
| 2,7-dimethyloktan-1-ol                | 37,36                   | –                      | –               | –               | 17,2             | –                | –                 | –                 | *       |
| 3,7-dimethyloktan-1-ol                | 37,38                   | –                      | –               | 24,2            | –                | –                | –                 | –                 | *       |
| Kyselina 2-methylmáselná              | 38,86                   | 0,05                   | 81,3            | 83,7            | –                | –                | –                 | –                 | ** [37] |
| Kyselina 3-methylmáselná              | 39,06                   | 0,10                   | –               | –               | 57,5             | 76,7             | 34,0              | –                 | ** [37] |
| Methyl ester mravenčí kyseliny        | 39,11                   | –                      | –               | –               | –                | –                | –                 | 92,4              | *       |
| Tridekan-7-on                         | 41,66                   | –                      | 79,3            | –               | –                | –                | –                 | –                 | *       |
| Kyselina pentanová                    | 43,16                   | 0,17                   | 76,1            | 78,3            | 79,7             | –                | –                 | –                 | ** [37] |
| Citronellol                           | 43,92                   | 0,03                   | 37,2            | 32,3            | 36,9             | 35,3             | –                 | –                 | *       |
| Tridekan-2-on                         | 45,88                   | –                      | –               | 34,0            | –                | –                | –                 | –                 | *       |
| Tetradekan-2-on                       | 45,89                   | –                      | –               | –               | –                | –                | 15,5              | –                 | *       |
| Kyselina 4-methylpentanová            | 46,54                   | 0,01                   | 64,3            | 72,1            | –                | –                | –                 | –                 | *       |
| Estragol                              | 46,86                   | –                      | –               | –               | 34,7             | –                | –                 | –                 | ** [40] |
| α-isomethyljonon                      | 47,56                   | –                      | –               | –               | 25,2             | –                | –                 | –                 | *       |
| Geraniol                              | 47,90                   | 0,02                   | –               | 53,9            | 49,7             | –                | –                 | –                 | *       |
| Kyselina hexanová                     | 48,42                   | 0,08                   | 59,5            | 49,5            | 52,6             | 51,3             | 44,9              | 51,4              | ** [37] |
| Benzylalkohol                         | 49,24                   | 0,02                   | 42,3            | 43,6            | 45,6             | 44,4             | 35,5              | 33,5              | ** [36] |
| 3-fenylprop-2-enal                    | 49,84                   | –                      | –               | –               | –                | –                | 29,0              | –                 | *       |
| Dimethylsulfon (Methylsulfonylmethan) | 50,34                   | 0,02                   | –               | 95,8            | –                | –                | 92,0              | 80,4              | *       |
| 2-fenylethanol                        | 50,63                   | –                      | –               | –               | –                | –                | 72,2              | –                 | ** [3]  |
| Tetrahydro-6-propyl-2H-pyran-2-on     | 52,70                   | 0,02                   | –               | –               | –                | –                | 14,5              | 75,2              | *       |

Tabulka 6d: Přehled aromaticky aktivních látek identifikovaných ve vzorcích sýrů zakoupených v běžné tržní síti (pokračování)

| Sloučeniny                          | T <sub>R</sub><br>[min] | δT <sub>R</sub><br>[%] | Em <sub>1</sub> | Em <sub>2</sub> | MBm <sub>1</sub> | MBm <sub>2</sub> | MBZm <sub>1</sub> | MBZm <sub>2</sub> |         |
|-------------------------------------|-------------------------|------------------------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|-------------------|-------------------|---------|
| Kyselina heptanová                  | 52,82                   | 0,15                   | 81,4            | 82,1            | 83,5             | 75,1             | 72,1              | 78,7              | ** [37] |
| Methyl ester tetradekanové kyseliny | 54,35                   | –                      | –               | –               | –                | –                | 39,5              | –                 | *       |
| Fenol                               | 54,64                   | –                      | –               | 57,1            | –                | –                | 32,8              | –                 | ** [40] |
| Benzyl ester benzoové kyseliny      | 56,66                   | –                      | –               | –               | –                | –                | 93,9              | 94,7              | *       |
| Kyselina oktanová                   | 56,78                   | 0,02                   | 52,7            | 52,6            | 53,5             | 68,5             | –                 | –                 | ** [37] |
| Kyselina nonanová                   | 60,38                   | 0,03                   | 85,7            | 82,5            | 74,8             | 60,8             | 88,5              | 73,1              | ** [37] |
| Tetrahydro-6-pentyl-2H-pyran-2-on   | 60,77                   | 0,02                   | –               | 63,2            | 53,0             | 51,5             | 61,6              | 56,2              | *       |
| Kyselina dekanová                   | 63,69                   | 0,03                   | 69,9            | 83,5            | 53,6             | 16,9             | 61,6              | 67,7              | ** [37] |

Značení vzorků viz Tabulka 4; hodnoty v tabulkách udávají pravděpodobnost shody dané sloučeniny s knihovnou spekter v %; \*\* látka aromaticky aktivní; \* látka pravděpodobně aromaticky aktivní

*Tabulka 7: Celkový souhrn sloučenin identifikovaných ve vzorcích sýrů (Značení vzorků viz Tabulka 4)*

| Sloučeniny                        | V1m <sub>1</sub> | V1m <sub>2</sub> | V2m <sub>1</sub> | V2m <sub>2</sub> | V3m <sub>1</sub> | V3m <sub>2</sub> | V4m <sub>1</sub> | V4m <sub>2</sub> | Em <sub>1</sub> | Em <sub>2</sub> | MBm <sub>1</sub> | MBm <sub>2</sub> | MBZm <sub>1</sub> | MBZm <sub>2</sub> |
|-----------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|-------------------|-------------------|
| Alkoholy                          | 15               | 13               | 17               | 14               | 14               | 11               | 16               | 15               | 10              | 13              | 12               | 10               | 13                | 4                 |
| Aldehydy                          | 4                | 2                | 2                | 2                | 4                | 4                | 5                | 3                | 1               | 1               | 1                | 1                | 4                 | 1                 |
| Ketony                            | 9                | 7                | 11               | 9                | 6                | 8                | 7                | 9                | 6               | 9               | 8                | 8                | 7                 | 5                 |
| Karboxylové kyseliny              | 10               | 7                | 8                | 7                | 7                | 9                | 7                | 6                | 11              | 11              | 10               | 8                | 8                 | 7                 |
| Estery                            | 5                | 4                | 7                | 3                | 3                | 3                | 4                | 3                | 0               | 5               | 0                | 2                | 9                 | 6                 |
| Ethery                            | 0                | 0                | 0                | 0                | 0                | 0                | 0                | 0                | 0               | 0               | 1                | 0                | 0                 | 0                 |
| Uhlovodíky                        | 4                | 2                | 5                | 5                | 2                | 4                | 3                | 3                | 1               | 1               | 1                | 1                | 2                 | 2                 |
| Sírné sloučeniny                  | 2                | 2                | 2                | 1                | 1                | 1                | 2                | 1                | 0               | 2               | 1                | 0                | 2                 | 1                 |
| Dusíkaté sloučeniny               | 0                | 2                | 0                | 1                | 0                | 0                | 0                | 0                | 1               | 0               | 1                | 1                | 1                 | 0                 |
| Celkem identifikovaných sloučenin | 49               | 39               | 52               | 42               | 37               | 40               | 44               | 40               | 30              | 42              | 35               | 31               | 46                | 26                |

*Tabulka 8: Přehled detekovaných nečistot (Značení vzorků viz Tabulka 4)*

[illegible]

## 5 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo identifikovat aromaticky aktivní látky ve vzorcích přírodních sýrů s vysokodohřívanou sýřeninou. Modelové vzorky byly vyrobeny na Univerzitě Tomáše Bati ve Zlíně za použití rozdílných poměrů mlékařských kultur. Pro srovnání byly analyzovány i komerční vzorky obdobných typů sýrů z běžné tržní sítě: Moravský bochník od firmy Madeta a Emmental od firmy Président.

Aromaticky aktivní látky jsou těkavé sloučeniny náležící do různých chemických skupin, např. alkoholů, karbonylových sloučenin, karboxylových kyselin a jejich esterů a další. Podílejí se na celkové chuti a aroma sýrů. Pro jejich izolaci byla vybrána metoda mikroextrakce pevnou fází a sloučeniny byly následně identifikovány plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí na základě srovnání hmotnostních spekter s dostupnou knihovnou spekter.

Celkem bylo ve vzorcích sýrů identifikováno 129 těkavých sloučenin, z toho 35 alkoholů, 9 aldehydů, 24 ketonů, 16 karboxylových kyselin, 23 esterů, 1 ether, 16 uhlovodíků, 2 sirné a 3 dusíkaté sloučeniny. Srovnáním s dostupnou literaturou 61 z identifikovaných sloučenin bylo označeno jako aromaticky aktivní.

Pro výrobu modelových sýrů byly použity tři komerčně dostupné lyofilizované kultury (mezofilní aromatická kultura, obsahující *Lactococcus* spp. a *Leuconostoc* spp., a dva typy termofilních kultur, *Lactobacillus helveticus* a *Streptococcus thermophilus*). Byly vyrobeny čtyři různé varianty sýrů s převažující mezofilní nebo termofilní kulturou. Mezi vzorky byly nalezeny rozdíly v počtu detekovaných látek, vliv kombinací uvedených kultur na počet identifikovaných sloučenin v sýrech však byl nejednoznačný. Nepodařilo se prokázat významný rozdíl mezi převahou použití mezofilní resp. termofilní kultury, přestože termofilní kultury mají obecně vyšší proteolytickou aktivitu, než klasická mezofilní kultura.

Počet identifikovaných sloučenin v modelových sýrech byl vyšší, než v sýrech komerčních, zvláště v případě komerčního Moravského bochníku. Vzhledem k ekonomické náročnosti zračního procesu v praxi tyto sýry běžně zrají cca 2 měsíce a poté jsou expedovány do tržní sítě. V důsledku toho mají méně výraznou chuť, neboť nemohou v dostatečném rozsahu proběhnout žádoucí biochemické procesy.

Jak vyplývá ze zjištěných výsledků, pro lepší vyjádření rozdílů mezi vzorky bude nezbytné použít vhodnou kvantifikační metodu; ta bude vybrána, ověřena a aplikována na další vzorky v navazujících experimentech.

## 6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] Vyhláška č. 397/2016 Sb., kterou se stanoví požadavky pro mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje § 1. In: *Sbírka zákonů*. 2016.
- [2] TEUBNER, Ch., H. MAIR-WALDBURG a F.-W. EHLERT. *Sýry - velká encyklopedie*. 11. vyd. Bratislava: Trio Publishing, 2003. ISBN 80-968705-1-3.
- [3] JANŠTOVÁ, B., L. VORLOVÁ, P. NAVRÁTILOVÁ, M. KRÁLOVÁ, L. NECIDOVÁ, E. MAŘICOVÁ. *Technologie mléka a mléčných výrobků*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2012. ISBN 8073056356.
- [4] ČEPIČKA, J. *Obecná potravinářská technologie*. Praha: VŠCHT, 1995, 246 s. ISBN 8070802391.
- [5] HASSAN, F. A. M., M. A.M. ABD EL-GAWAD a A.K. ENAB. Flavour compounds in cheese (review). *International Journal of Academic Research*. 2012, vol. 4, no. 5, pp. 169-181. ISSN 20754124. DOI: 10.7813/2075-4124.2012/4-5/A.20.
- [6] ŠNIRC, V., GOLIAN, J., HERIAN, K., BUŇKA, F., BUŇKOVÁ, L., ČANIGOVÁ, M. *Mlieko a mliečne výrobky. I. diel Štruktúra, bioaktívne zložky a spracovanie mlieka*. 1. vyd. Nitra: Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, 2015, 221 s. ISBN 978-80-552-1311-8.
- [7] FORMAN, L. a kol.: *Mlékárenská technologie II*. 2. vyd. Praha: VŠCHT, 1996. 228 s. ISBN 80-7080-250-2
- [8] PAVELKA, A. *Mléčné výrobky pro vaše zdraví*. Brno: Litera, 1996. ISBN 8085763095.
- [9] KADLEC, P. *Technologie potravin II*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2002. ISBN 8070805102.
- [10] DRDÁK, M., J. STUDENICKÝ, E. MÓROVÁ a J. KAROVIČOVÁ. *Základy potravinářských technologií: spracovanie rastlinných a živočišných surovín cereálne a fermentačné technológie uchovávanie, hygiena a ekológia potravín*. 1. vyd. Bratislava: Malé centrum, 1996. ISBN 8096706411.
- [11] Zapomenuté sýry. *Laktos collection* [online]. 2009 [cit. 2016-11-13]. Dostupné z: <http://laktoscollection.cz/view.php?nazev=zapomenute-syry&cislocclanku=2009080009>
- [12] VELÍŠEK, J. a J. HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin. I. Rozš. a přeprac.* 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009, xxii, 580 s. ISBN 9788086659176.
- [13] DIRINCK, P. a A. DE WINNE. Flavour characterisation and classification of cheeses by gas chromatographic-mass spectrometric profiling. *Journal of Chromatography A*. Elsevier B.V, 1999, vol. 847, no. 1, pp. 203-208. ISSN 00219673. DOI: 10.1016/S0021-9673(99)00193-4.



- [14] COLLINS, Y. F., P. L. H., MCSWEENEY a M.G. WILKINSON. Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. *International Dairy Journal*. 2003, vol. 13, no. 11, pp. 841-866. ISSN 09586946. DOI: 10.1016/S0958-6946(03)00109-2.
- [15] SMIT, G., A. VERHEUL, R. VAN KRANENBURG, E. AYAD, R. SIEZEN a W. ENGELS. Cheese flavour development by enzymatic conversions of peptides and amino acids. *Food Research International*. Elsevier Ltd, 2000, vol. 33, no. 3, pp. 153-160. ISSN 09639969. DOI: 10.1016/S0963-9969(00)00029-6.
- [16] MCSWEENEY, P. L. H. Biochemistry of cheese ripening. *International Journal of Dairy Technology*. 2004, vol. 57, no. 2-3, pp. 127-144. ISSN 1364727. DOI: 10.1111/j.1471-0307.2004.00147.
- [17] ARDÖ, Y. Flavour formation by amino acid catabolism. *Biotechnology Advances*. Elsevier Inc, 2006, vol. 24, no. 2, pp. 238-242. ISSN 07349750. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2005.11.005.
- [18] SMIT, G., B. A. SMIT a W.J.M. ENGELS. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiology Reviews*. Oxford, UK: Blackwell Publishing, 0508, vol. 29, no. 3, pp. 591-610. ISSN 01686445. DOI: 10.1016/j.fmrre.2005.04.002.
- [19] MARILLEY, L a M. G. CASEY. Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. *International Journal of Food Microbiology*, 2004, vol. 90, no. 2, pp. 139-159. ISSN 01681605. DOI: 10.1016/S0168-1605(03)00304-0.
- [20] HEAVEN, M. W. a D. NASH. Recent analyses using solid phase microextraction in industries related to food made into or from liquids. *Food Control*. 2012, vol. 27, no. 1, pp. 214-227. ISSN 09567135. DOI: 10.1016/j.foodcont.2012.03.018.
- [21] FRECHOVÁ, V. *Stanovení aromaticky aktivních látek ve vybraných typech ovoce*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011, 102 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Eva Vítová, Ph. D.
- [22] SONG, J., Ch. F. FORNEY a M. A. JORDAN. A method to detect diphenylamine contamination of apple fruit and storages using headspace solid phase micro-extraction and gas chromatography/mass spectroscopy. *Food Chemistry*. Elsevier Ltd, 2014, vol. 160, pp. 255-259. ISSN 03088146. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.03.099.
- [23] PAWLISZYN, J. *Solid phase microextraction: theory and practice*. New York: Wiley-VCH, 1997. ISBN 0471190349.
- [24] BARTELT, R. J. Calibration of a Commercial Solid-Phase Microextraction Device for Measuring Headspace Concentrations of Organic Volatiles. *Analytical chemistry*. 1997, vol. 69, no. 3, pp. 364-372. ISSN 15206882.

- [25] SOMMER, Lumír. *Základy analytické chemie II*. 1. vyd. Brno: VUTIUM, 2000, 347 s. ISBN 8021417420.
- [26] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003, 132 s. ISBN 8086369072.
- [27] CLEMENT, R. E. *Gas chromatography: biochemical, biomedical, and clinical applications*. New York: John Wiley and Sons, 1990, 393 s. ISBN 0471010480.
- [28] VOLKA, K. *Analytická chemie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1995. ISBN 8070802278.
- [29] BARKER, J., ANDO, D. J. *Mass spectrometry: analytical chemistry by Open Learning*. 2nd ed. Chichester: John Wiley & Sons, 1999. Analytical chemistry by Open Learning. ISBN 0471967629.
- [30] BOLECHOVÁ, M. *Využití separačních metod s hmotnostní detekcí pro studium degradačních produktů nových polymerních materiálů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009, 105 s. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc.
- [31] ŠTULÍK, K. *Analytické separační metody*. Praha: Karolinum, 2004. ISBN 8024608529.
- [32] CHAUHAN, A. GC-MS Technique and its Analytical Applications in Science and Technology. *Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques*. 2014, vol. 5, no. 6. ISSN 21559872. DOI: 10.4172/2155-9872.1000222.
- [33] MONDELLO, L., P. Q. TRANCHIDA, P. DUGO a G. DUGO. Comprehensive two-dimensional gas chromatography-mass spectrometry: A review. *Mass Spectrometry Reviews*. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company, 2008, vol. 27, no. 2, pp. 101-124. ISSN 10982787. DOI: 10.1002/mas.20158.
- [34] CHROMAcademy. *Fundamentals of using gas chromatography with mass spectrometric detectors* [online]. [cit. 2017-04-01]. Dostupné z: [http://www.chromacademy.com/resolver-november2010\\_understanding\\_gcms\\_part\\_1.html](http://www.chromacademy.com/resolver-november2010_understanding_gcms_part_1.html)
- [35] HEMPFLING, K., O. FASTOWSKI, M. KOPP, M. P. NIKFARDJAM, K. H. ENGEL. Analysis and Sensory Evaluation of Gooseberry (*Ribes uva crisa* L.) Volatiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2013, vol. 61, no. 26, pp. 6240-6249. ISSN 0021-8561. DOI: 10.1021/jf401310v.
- [36] SANCHEZ-PALOMO, E., E. G. GARCIA-CARPINTERO, R. ALONSO-VILLEGAS, M. A. GONZALEZ-VINAS. Characterization of aroma compounds of Verdejo white wines from the La Mancha region by odour activity values. *Flavour and Fragrance Journal*, 2010, vol. 25, no. 6, pp. 456–462. ISSN: 0882-5734.
- [37] VÍTOVÁ, Eva. *Hodnocení tvorby těkavých senzoryicky účinných látek mikrobiálních metabolitů a jejich charakterizace (Evaluation of volatile sensory active microbiological metabolites and their characterization)*. Brno, 2003. Disertační práce. VUT FCH, 110 s. Vedoucí práce Prof. Ing. Milan Drdák, DrSc.

- [38] FRANK, D. C., C. M. OWEN, J. PATTERSON. Solid phase microextraction (SPME) combined with gas-chromatography and olfactometry-mass spectrometry for characterization of cheese aroma compounds. *Food Science and Technology-Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 2004, vol. 37, no. 2, pp. 139-154. ISSN 0023-6438. DOI: 10.1016/S0023-6438(03)00144-0.
- [39] SÁDECKÁ, J. M. POLOVKA, E. KOLEK, E. BELAJOVÁ, B. TOBOLKOVÁ, Ľ. DAŠKO, J. DUREC. Orange juice with pulp: Impact of pasteurization and storage on flavour, polyphenols, ascorbic acid and antioxidant activity. *Journal of Food and Nutrition Research*, 2014, vol. 53, no. 4, pp. 371-388. ISSN 1336-8672
- [40] BELITZ, H.-D., W. GROSCH, P. SCHIEBERLE. Food Chemistry. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*, 2009. 989 p. ISBN 978-3-540-69933-0. DOI 10.1007/978-3-540-69934-7
- [41] SYMPOURA, F., A. CORNU, P. TOURNAYRE, T. MASSOURAS, J. L. BERDAGUÉ a B. MARTIN. Odor compounds in cheese made from the milk of cows supplemented with extruded linseed and  $\alpha$ -tocopherol. *Journal of Dairy Science*. 2009, vol. 92, no. 7, pp. 3040-3048. ISSN 00220302. DOI: 10.3168/jds.2008-1802.
- [42] KOUBEK, M. *Optimalizace a validace GC-MS metody pro stanovení těkavých aromaticky aktivních látek v sýrech*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016, 65 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Eva Vítová, Ph. D.

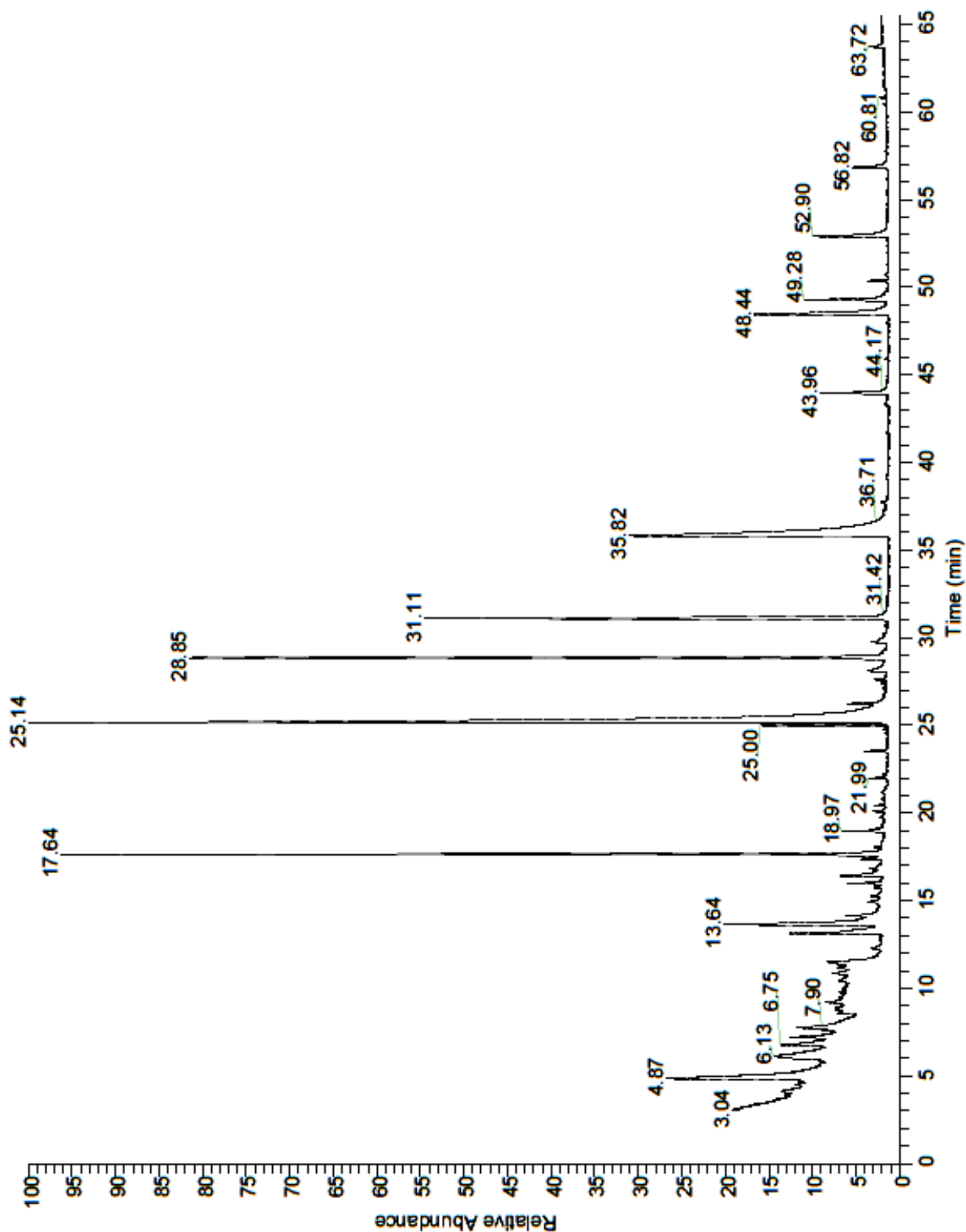
## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

|                 |   |
|-----------------|---|
| tv <sub>s</sub> | tuk v sušině  |
| SPME            | mikroextrakce pevnou fází (solid phase microextraction) |
| GC              | plynová chromatografie (gas chromatography)             |
| MS              | hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry)            |
| m/z             | podíl hmotnosti a náboje (mass-to-charge)               |
| EI              | elektronová ionizace (electron impact)                  |
| T <sub>R</sub>  | aritmetický průměr retenčních časů                      |
| δT <sub>R</sub> | relativní odchylka                                      |

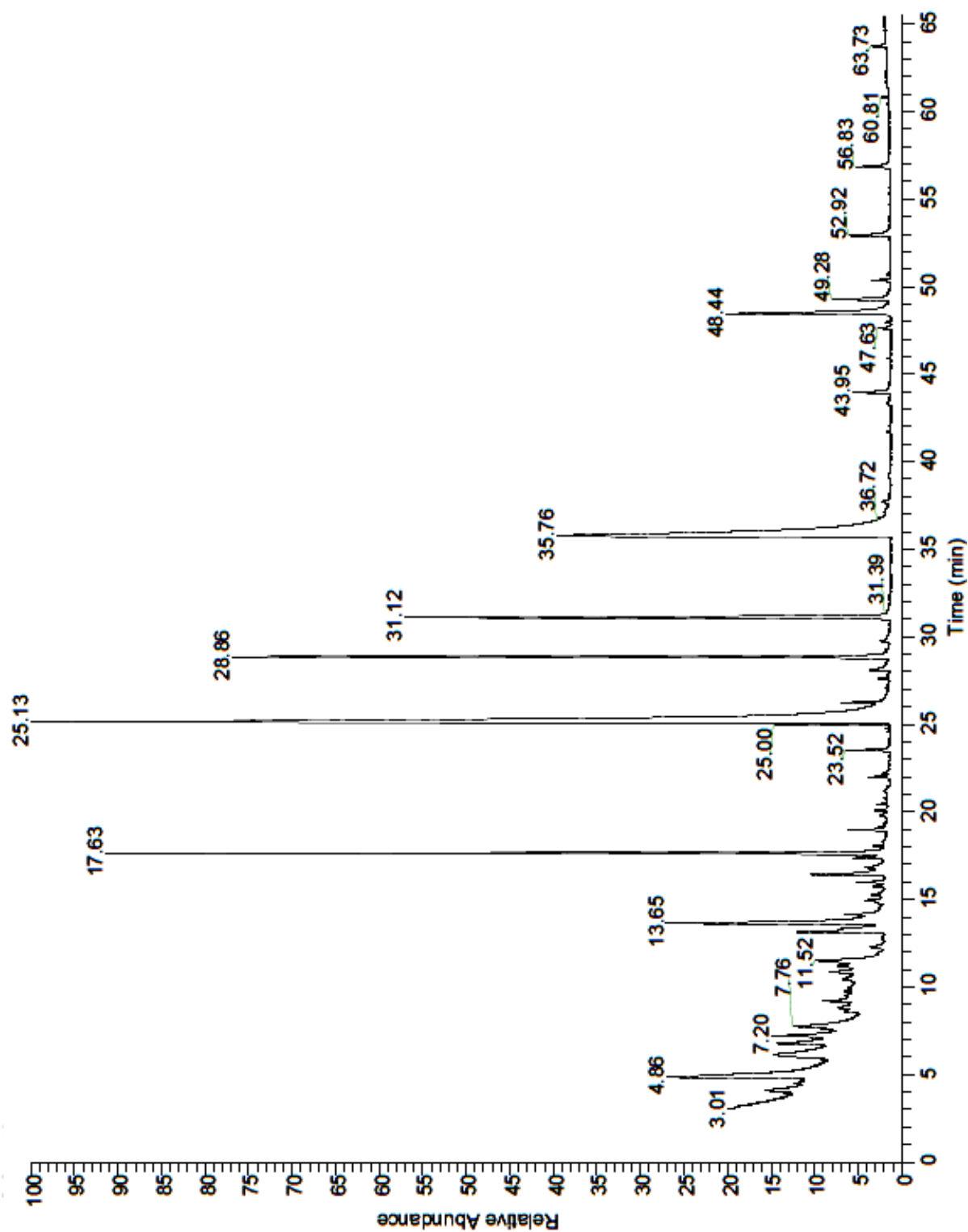
## 8 PŘÍLOHY

|           |  |
|-----------|--|
| Příloha 1 | Chromatogram aromaticky aktivních látek ve vzorku V1   |
| Příloha 2 | Chromatogram aromaticky aktivních látek ve vzorku V2   |
| Příloha 3 | Chromatogram aromaticky aktivních látek ve vzorku V3   |
| Příloha 4 | Chromatogram aromaticky aktivních látek ve vzorku V4   |
| Příloha 5 | Chromatogram aromaticky aktivních látek ve vzorku Président Emmental                             |
| Příloha 6 | Chromatogram aromaticky aktivních látek ve vzorku Madeta Moravský bochník                        |
| Příloha 7 | Chromatogram aromaticky aktivních látek ve vzorku Madeta Moravský bochník (po 1 měsíci zmražení) |

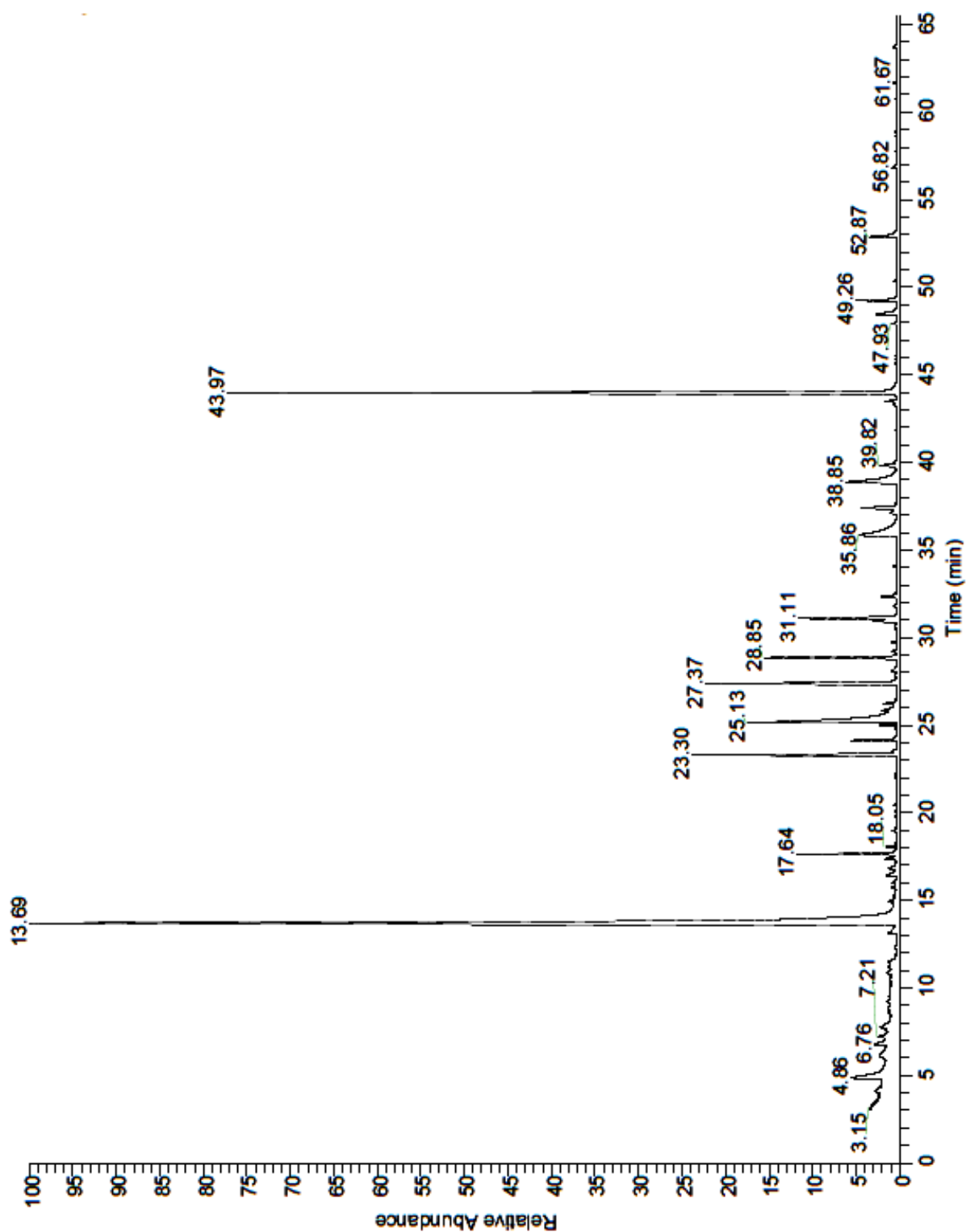
Příloha 1: Chromatogram aromaticky aktivních látek ve vzorku V1; identifikace sloučenin na základě retenčních časů (viz Tabulka 5)



Příloha 2: Chromatogram aromaticky aktivních látek ve vzorku V2; identifikace sloučenin na základě retenčních časů (viz Tabulka 5)

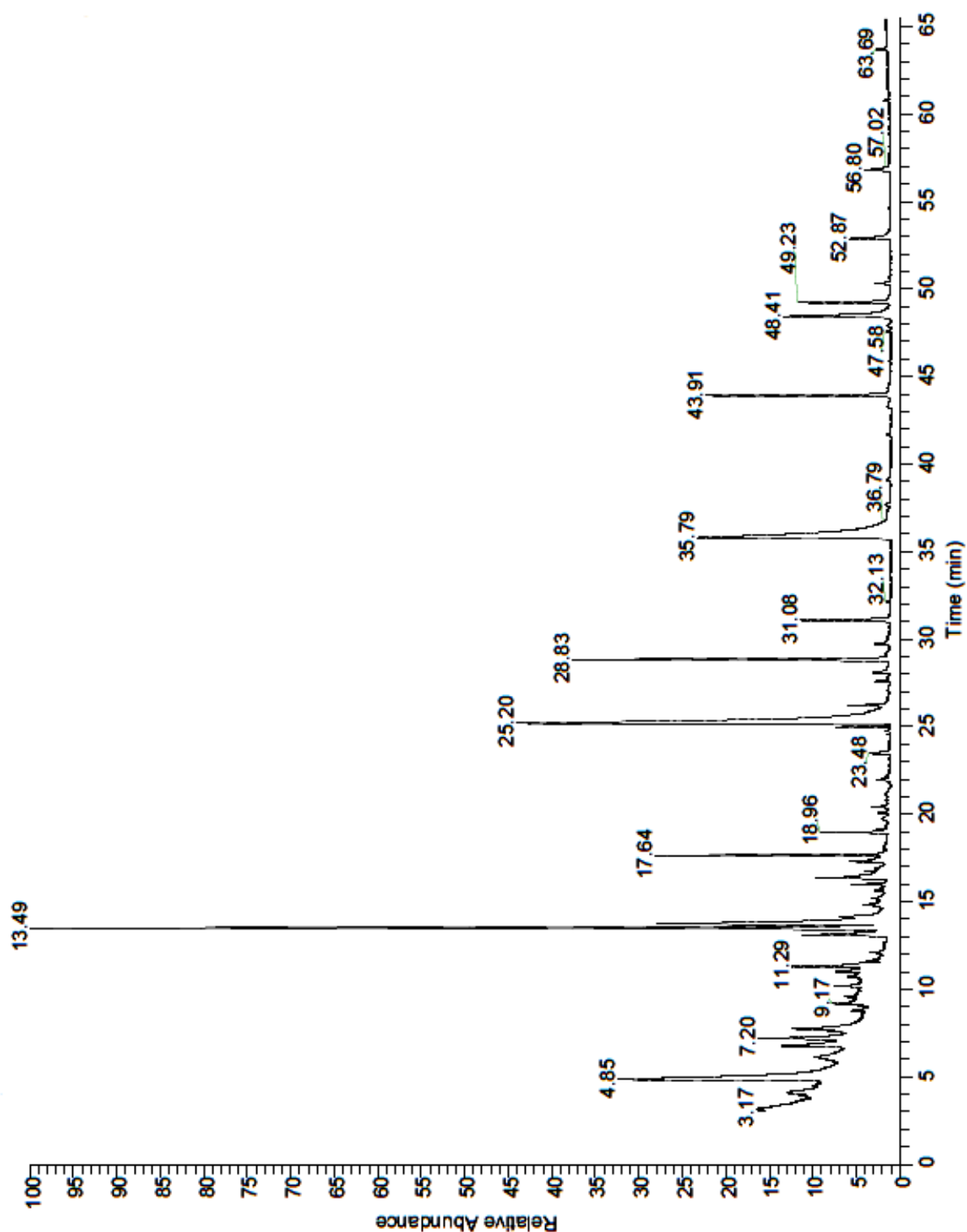


Příloha 3: Chromatogram aromaticky aktivních látek ve vzorku V3; identifikace sloučenin na základě retenčních časů (viz Tabulka 5)

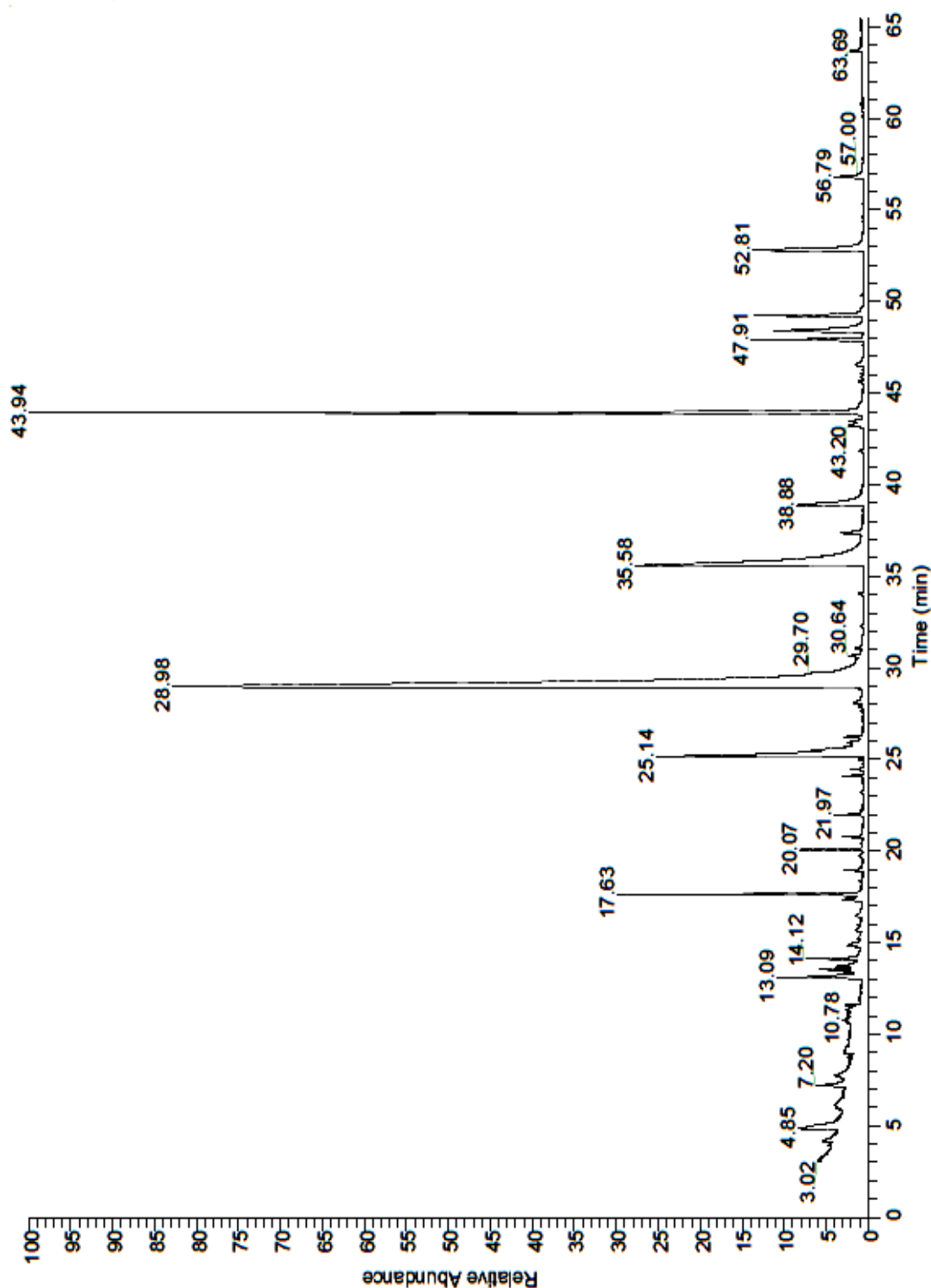




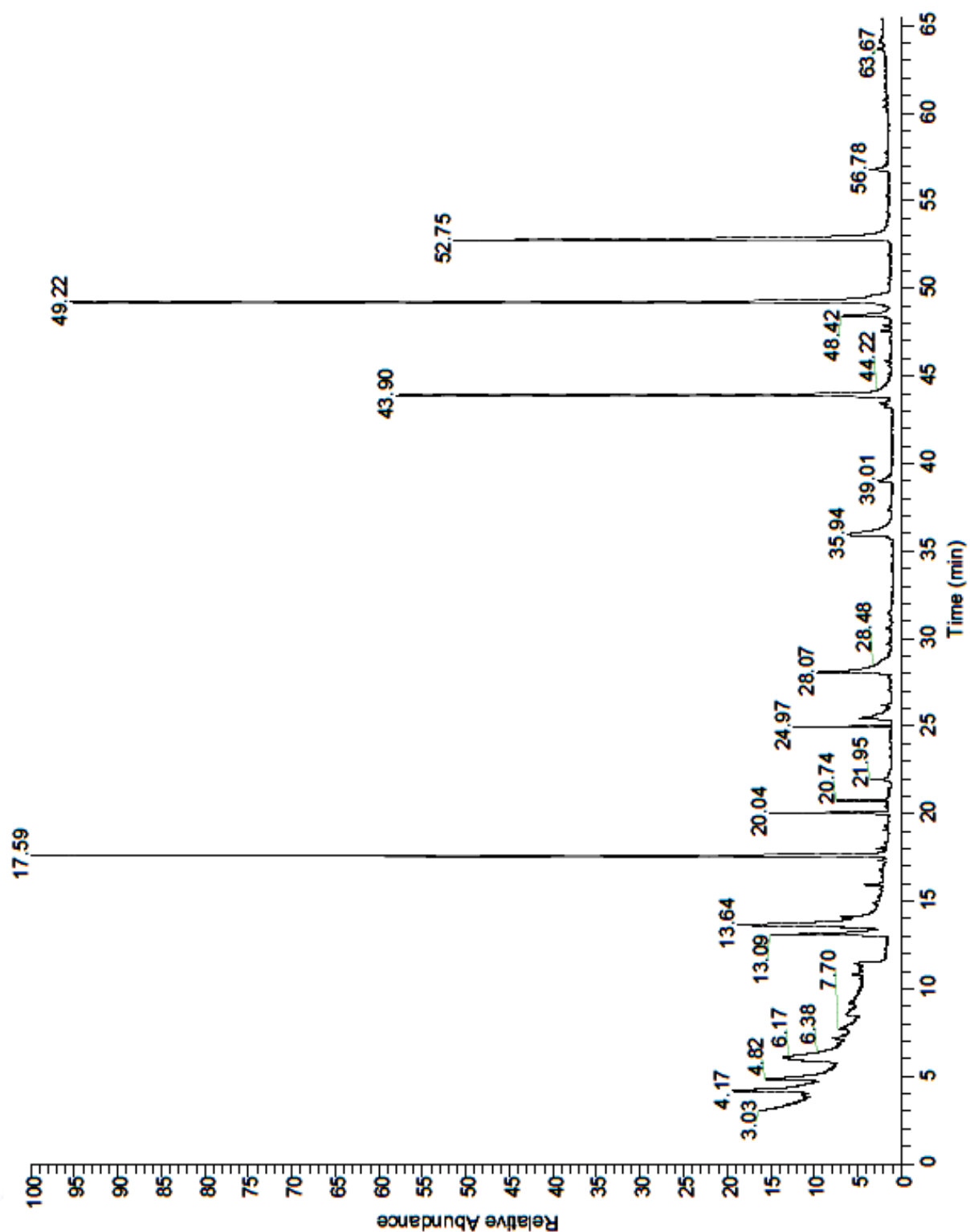
Příloha 4: Chromatogram aromaticky aktivních látek ve vzorku V4; identifikace sloučenin na základě retenčních časů (viz Tabulka 5)



Příloha 5: Chromatogram aromaticky aktivních látek ve vzorku Président Emmmental; identifikace sloučenin na základě retenčních časů (viz Tabulka 6)



Příloha 6: Chromatogram aromaticky aktivních látek ve vzorku Madeta Moravský bochník; identifikace sloučenin na základě retenčních časů (viz Tabulka 6)



Příloha 7: Chromatogram aromaticky aktivních látek ve vzorku Madeta Moravský bochník (po 1 měsíci zmražení); identifikace sloučenin na základě retenčních časů (viz Tabulka 6)

